

**TCVN**

**TIÊU CHUẨN QUỐC GIA**

**TCVN 9855-1:2013  
ISO 11138-1:2006**

**TIỆT KHUẨN SẢN PHẨM CHĂM SÓC SỨC KHỎE -  
CHẤT CHỈ THỊ SINH HỌC - PHẦN 1: YÊU CẦU CHUNG**

*Sterilization of health care products - Biological indicators - Part 1: General requirements*

**HÀ NỘI - 2013**

## Mục lục

	Trang
Lời nói đầu.....	4
Lời giới thiệu.....	5
1 Phạm vi áp dụng.....	7
2 Tài liệu viện dẫn.....	7
3 Thuật ngữ và định nghĩa.....	8
4 Yêu cầu chung đối với sản xuất.....	11
5 Các yêu cầu cụ thể khi sản xuất.....	14
6 Xác định sức đề kháng.....	16
7 Điều kiện nuôi cấy.....	18
Phụ lục A (quy định) - Xác định số vi sinh vật sống.....	19
Phụ lục B (quy định) - Xác định sự ức chế tăng trưởng của vi sinh vật bằng các chất mang và chất liệu bao gói trực tiếp khi tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn.....	21
Phụ lục C (quy định) - Xác định giá trị D bằng phương pháp đường cong sống sót.....	24
Phụ lục D (quy định) - Giá trị D tính theo phương pháp phân số âm.....	28
Phụ lục E (quy định) - Các đặc trưng đáp ứng tồn tại-tiêu diệt.....	43
Phụ lục F (quy định) - Mối liên quan giữa các thành phần của chất chỉ thị sinh học.....	45
Thư mục tài liệu tham khảo.....	46

## Lời nói đầu

**TCVN 9855-1:2013** hoàn toàn tương đương với ISO 11138-1:2006;

**TCVN 9855-1:2013** do Viện Trang thiết bị và Công trình y tế biên soạn, Bộ Y tế đề nghị, Tổng cục Tiêu chuẩn Đo lường Chất lượng thẩm định, Bộ Khoa học và Công nghệ công bố.

Bộ TCVN 9855:2013 *Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khoẻ - Chất chỉ thị sinh học* gồm các tiêu chuẩn sau:

- TCVN 9855-1:2013 (ISO 11138-1:2006) - Phần 1: Yêu cầu chung.
- TCVN 9855-2:2013 (ISO 11138-2:2006) - Phần 2: Chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt khuẩn bằng etylen oxit.
- TCVN 9855-3:2013 (ISO 11138-3:2006) - Phần 3: Chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm.
- TCVN 9855-4:2013 (ISO 11138-4:2006) - Phần 4: Chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt khuẩn bằng nhiệt khô.
- TCVN 9855-5:2013 (ISO 11138-5:2006) - Phần 5: Chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt khuẩn bằng hơi nước nhiệt độ thấp và quá trình tiệt khuẩn bằng formaldehyd.

## Lời giới thiệu

Tiêu chuẩn này đưa ra các yêu cầu chung đối với việc sản xuất, ghi nhãn, phương pháp thử và các yêu cầu đối với các hoạt động sản xuất chất chỉ thị sinh học bao gồm cả các chất mang và dịch treo dùng để đánh giá và giám sát quá trình tiệt khuẩn. TCVN 9855-1 (ISO 11138-1) đưa ra các yêu cầu cụ thể đối với các chất chỉ thị sinh học dành cho các quá trình tiệt khuẩn nhất định.

Mô tả bằng hình ảnh của một chất chỉ thị sinh học và các thành phần được trình bày trong Phụ lục F. Phần trình bày bao gồm hai loại chất chỉ thị sinh học được đề cập đến trong bộ TCVN 9855 (ISO 11138). Điều này cho thấy các chất mang có thể tiếp xúc trực tiếp với chất tiệt khuẩn không được bao gói trước, hoặc đã được bao gói trực tiếp nhưng cho phép các chất tiệt khuẩn có thể tiếp cận được.

Đặc tính đề kháng phụ thuộc vào loại vi sinh vật thử nghiệm, số lượng của nó, phương pháp chuẩn bị và tác dụng của việc bao gói trực tiếp. Lời khuyên về việc lựa chọn, sử dụng và diễn giải kết quả của các chất chỉ thị sinh học có thể tham khảo trong TCVN 8583 (ISO 14161<sup>[7]</sup>).

Đối với bất kỳ một quá trình tiệt khuẩn đơn lẻ nào, kể cả các quá trình đề cập trong các phần của bộ TCVN 9855 (ISO 11138), sức đề kháng của một chất chỉ thị sinh học còn phụ thuộc vào môi trường vi mô trong quá trình thử nghiệm. Về mặt lý thuyết, sức đề kháng có thể dẫn đến sự đa dạng vô hạn trong khi chuẩn bị các chất chỉ thị sinh học. Hơn nữa, quá trình tiệt khuẩn có thể được điều chỉnh bằng nhiều cách khác nhau cho phù hợp từng nhóm điều kiện mà sản phẩm có thể tiếp xúc. Vì vậy, trong thực hành thường quy, việc sản xuất các chất chỉ thị sinh học mà khi tiếp xúc với các nhóm điều kiện trong một quá trình tiệt khuẩn đã được xác định, có các đặc tính đề kháng được biểu thị bằng các giá trị D và giá trị z khi phù hợp. Các giá trị này được trình bày trong các phần của TCVN 9855 (ISO 11138).

Bộ TCVN 9855 (ISO 11138), từ phần 1 đến phần 5 thể hiện thực trạng kỹ thuật mới nhất theo các chuyên gia đại diện cho các nhà sản xuất, người sử dụng và các cơ quan quản lý liên quan đến việc soạn thảo tiêu chuẩn này.

Các chất chỉ thị sinh học cho các quá trình tiệt khuẩn cụ thể không được nói đến trong các điều kiện thử nghiệm đối chứng của các phần khác trong bộ TCVN 9855 (ISO 11138) cần tuân theo các yêu cầu chung của tiêu chuẩn này, bao gồm các kỹ thuật thử sức đề kháng. Các chất chỉ thị sinh học như vậy có thể không được mô tả đầy đủ, hoặc có thể được sử dụng cho các quá trình tiệt khuẩn mới, hoặc có thể được đại diện bởi các vi sinh vật là vi sinh vật tạp nhiễm đã được phân lập. Nếu các vi sinh vật nằm ngoài các vi sinh vật nguy cơ nhóm 1 (WHO, 1993<sup>[27]</sup>) được bao gồm trong các chất chỉ thị sinh học này, các biện pháp ngăn ngừa và các biện pháp an toàn phù hợp cần được đáp ứng.

Các tiêu chuẩn hiện tại cung cấp các yêu cầu cho việc đánh giá và kiểm soát các quá trình tiệt khuẩn (xem Thư mục tài liệu tham khảo).

**CHÚ THÍCH** Một số quốc gia hoặc khu vực có thể ban hành các tiêu chuẩn khác bao gồm các yêu cầu về tiệt khuẩn hoặc các chất chỉ thị sinh học (xem Thư mục tài liệu tham khảo).

# Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe - Chất chỉ thị sinh học

## Phần 1: Yêu cầu chung

*Sterilization of health care products – Biological indicators –*

*Part 1: General requirements*

### 1 Phạm vi áp dụng

#### 1.1 Tổng quan

**1.1.1** Tiêu chuẩn này cung cấp các yêu cầu chung áp dụng cho sản xuất, ghi nhãn, phương pháp thử và đặc trưng tính năng của các chất chỉ thị sinh học, bao gồm chất mang, dịch treo và các thành phần của chúng, được sử dụng trong quá trình đánh giá xác nhận và theo dõi thường quy các quá trình tiệt khuẩn.

**1.1.2** Tiêu chuẩn này quy định các yêu cầu cơ bản và yêu cầu chung áp dụng cho tất cả các phần khác thuộc bộ TCVN 9855 (ISO 11138). Các yêu cầu đối với chất chỉ thị sinh học trong quá trình cụ thể đã được quy định có trong các phần khác của bộ TCVN 9855 (ISO 11138). Nếu không đề cập đến phần nào cụ thể thì áp dụng tiêu chuẩn này.

**CHÚ THÍCH** Có thể áp dụng các quy định quốc gia hoặc khu vực.

#### 1.2 Phạm vi loại trừ

Tiêu chuẩn này không áp dụng đối với hệ thống thử nghiệm vi sinh trong các quá trình dựa trên việc loại bỏ vật lý của vi sinh vật, ví dụ như các quá trình lọc hoặc các quá trình kết hợp việc loại bỏ vật lý và/hoặc cơ học kết hợp với việc bất hoạt vi sinh vật, như sử dụng chất tẩy rửa, hoặc xả rửa và dùng hơi nước để làm sạch các đường ống. Tuy nhiên, tiêu chuẩn này có thể bao gồm các yếu tố liên quan đến các hệ thống thử nghiệm vi sinh vật như vậy.

### 2 Tài liệu viện dẫn

Các tài liệu viện dẫn sau đây là cần thiết để áp dụng tiêu chuẩn này. Đối với các tài liệu viện dẫn ghi năm công bố thì áp dụng bản được nêu. Đối với các tài liệu viện dẫn không ghi năm công bố thì áp dụng phiên bản mới nhất, bao gồm cả các sửa đổi, bổ sung (nếu có).

TCVN 6196 (ISO15223), *Thiết bị y tế - Ký hiệu sử dụng trên nhãn và ý nghĩa ký hiệu*

TCVN 7392:2004 (ISO11135:1994), *Trang thiết bị y tế - Xác nhận và kiểm soát thường quy tiệt trùng bằng etylen oxit*

TCVN 9855-1:2013

TCVN 7393-1 (ISO11137-1), *Tiệt khuẩn các sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Bức xạ – Phần 1: Yêu cầu triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy quá trình tiệt khuẩn đối với trang thiết bị y tế*

TCVN 7393-2 (ISO11137-2), *Tiệt khuẩn các sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Bức xạ – Phần 2: Thiết lập liều tiệt khuẩn*

TCVN 7393-3 (ISO11137-3), *Tiệt khuẩn các sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Bức xạ – Phần 3: Hướng dẫn về khía cạnh đo liều lượng*

TCVN 7394-1 (ISO11607-1), *Bao gói trang thiết bị y tế đã tiệt khuẩn – Phần 1: Yêu cầu đối với vật liệu, hệ thống bảo vệ vô khuẩn và hệ thống bao gói*

TCVN 7394-2 (ISO11607-2), *Bao gói trang thiết bị y tế đã tiệt khuẩn – Phần 2: Yêu cầu đánh giá xác nhận đối với quá trình tạo hình, niêm phong và lắp ráp*

TCVN ISO 8601, *Phần tử dữ liệu và dạng thức trao đổi. Trao đổi thông tin. Biểu diễn thời gian*

TCVN ISO 13485, *Dụng cụ y tế - Hệ thống quản lý chất lượng – Yêu cầu đối với các mục đích chế định*

ISO 11737-1, *Sterilization of medical devices - Microbiological methods - Part 1: Estimation of population of microorganisms on products (Tiệt khuẩn thiết bị y tế - Phương pháp vi sinh vật - Phần 1: Xác định quần thể vi sinh vật trên sản phẩm).*

ISO 17665-1, *Sterilization of health care products - Moist heat - Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe - Âm nhiệt độ cao - Phần 1: Yêu cầu đối với việc triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy quá trình tiệt khuẩn thiết bị y tế).*

ISO 18472, *Sterilization of health care products - Biological and chemical indicators - Test equipment (Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe - Các chất chỉ thị sinh học và hoá học - Thiết bị thử nghiệm)*

### **3 Thuật ngữ và định nghĩa**

Trong tiêu chuẩn này, áp dụng các thuật ngữ và định nghĩa sau:

#### **3.1**

**Chất chỉ thị sinh học (biological indicator)**

Hệ thống thử chứa các vi sinh vật sống có sức đề kháng nhất định đối với quá trình tiệt khuẩn quy định.

[ISO/TS11139, định nghĩa 2.3]

#### **3.2**

**Chất mang (carrier)**

Các chất hỗ trợ trên các vi sinh vật thử được cấy vào.

## 3.3

**Đơn vị tạo khuẩn lạc (conoly forming unit)**

**CFU**

Các đơn vị có thể nhìn thấy được của vi sinh vật phát triển từ một hoặc nhiều tế bào.

## 3.4

**Số sưu tập của vi sinh vật nuôi cấy (culture collection number)**

Mã xác định tính duy nhất của vi sinh vật thử nghiệm được cấp bởi một bộ sưu tập vi sinh vật đã được công nhận một cách khoa học.

## 3.5

**Điều kiện nuôi cấy (culture condition)**

Sự kết hợp giữa môi trường nuôi cấy và cách nuôi cấy được sử dụng để thúc đẩy sự phát triển hoặc nhân lên của các vi sinh vật

**CHÚ THÍCH** Cách nuôi cấy có thể bao gồm nhiệt độ, thời gian và bất cứ điều kiện nuôi cấy cụ thể nào khác.

[ISO/TS11139, định nghĩa 2.10]

## 3.6

**Giá trị D (D value)**

**Giá trị D<sub>10</sub> (D<sub>10</sub> value)**

Thời gian hoặc liều cần thiết để khử 90% hoạt tính quần thể vi sinh vật thử trong các điều kiện quy định

[ISO/TS11139, định nghĩa 2.11]

## 3.7

**Giá trị F<sub>BIO</sub> (F<sub>BIO</sub> value)**

Tích logarit của quần thể vi sinh vật ban đầu và giá trị D, trong đó giá trị F<sub>BIO</sub> có thể dùng để biểu thị tổng sức kháng của chất chỉ thị sinh học

## 3.8

**Bất hoạt (inactivation)**

Mất khả năng phát triển và/hoặc nhân lên của vi sinh vật

[ISO/TS11139, định nghĩa 2.21]

## 3.9

**Đường cong bất hoạt (inactivation curve)**

Biểu đồ trình bày sự bất hoạt của vi sinh vật thử nghiệm chống lại sự gia tăng tiếp xúc với chất diệt khuẩn trong những điều kiện nhất định

## 3.10

**Vật liệu mang chủng (inoculated carrier)**

Vật liệu phụ trợ trong hoặc trên đó có một số lượng xác định các sinh vật thử nghiệm

**CHÚ THÍCH** Xem Phụ lục F

**3.11**

**Quần thể danh nghĩa** (nominal population)

Số lượng vi sinh vật sống được do nhà sản xuất công bố.

CHÚ THÍCH Thường được diễn giải theo hàm  $\log_{10}$  (ví dụ:  $10^6$ ).

**3.12**

**Hệ thống bao gói** (packaging system)

Sự kết hợp giữa hệ thống ngăn vô khuẩn và bao gói bảo vệ

[ISO/TS11139, định nghĩa 2.28]

**3.13**

**Bao gói trực tiếp** (primary package)

Công đoạn của hệ thống bao gói duy trì tính toàn vẹn của sản phẩm

CHÚ THÍCH Hệ thống bao gói bảo vệ các vật liệu mang chủng khỏi bị hỏng và lây nhiễm mà không ngăn cản sự thâm nhập của chất tiệt khuẩn

**3.14**

**Thiết bị kiểm chứng quá trình** (process challenge device)

**PCD**

Hạng mục được thiết kế để tạo nên một khả năng xác định chịu quá trình tiệt khuẩn và dùng để đánh giá hiệu năng của quá trình

[ISO/TS11139, định nghĩa 2.33]

**3.15**

**Thiết bị đo các tổ hợp đối chứng** (resistometer)

Thiết bị thử được thiết kế để đo các tổ hợp đối chứng xác định gồm các biến vật lý và/hoặc hóa học của quá trình tiệt khuẩn

**3.16**

**Bao gói trung gian** (secondary package)

Vật chứa chất chỉ thị sinh học đã được bao gói để vận chuyển và bảo quản

**3.17**

**Chất chỉ thị sinh học tích hợp sẵn** (self-contained biological indicator)

Chất chỉ thị sinh học có mặt theo cách các bao bì bao gói trực tiếp, nhằm mục đích để nuôi cấy, chứa các môi trường nuôi cấy cần thiết để cho vi sinh vật hồi phục

**3.18**

**Cửa sổ tồn tại-tiêu diệt** (survival-kill window)

Mức độ tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn trong các điều kiện xác định tại đó có sự chuyển đổi từ tất cả các chất chỉ thị sinh học thể hiện sự tăng trưởng (thời gian tồn tại) sang tất cả các chất chỉ thị sinh học thể hiện sự không tăng trưởng (thời gian tiêu diệt)



**3.19****Dịch treo (suspension)**

Sinh vật sống thử nghiệm ở trạng thái treo trong dịch

**CHÚ THÍCH** Dịch treo có thể là chất chỉ thị sinh học nếu được ở trạng thái sẵn sàng cho sử dụng trong lọ gắn kín, hoặc có thể là thành phần trung gian được sử dụng để sinh ra một chất mang đã cấy hoặc chất chỉ thị sinh học

**3.20****Số lượng sống (viable count)**

Số lượng cụ thể của các đơn vị khuẩn lạc có thể hồi phục hoặc các đơn vị phù hợp khác

**CHÚ THÍCH** Xem Phụ lục A.

**3.21****Giá trị z (z value)**

Thay đổi về nhiệt độ tiếp xúc của quá trình tiệt khuẩn bằng nhiệt, tương ứng với 10 lần thay đổi giá trị D

**CHÚ THÍCH** Xem TCVN 9855-3 (ISO 11138-3) và TCVN 9855-4 (ISO 11138-4).

**4 Yêu cầu chung đối với sản xuất****4.1 Giám sát sản xuất****4.1.1 Hệ thống chất lượng**

Nhà sản xuất cần thiết lập, ghi thành văn bản và duy trì một hệ thống kiểm tra chất lượng chính thức (ví dụ, TCVN ISO 13485 (ISO 13485)), chuẩn GMP hoặc các yêu cầu khác của quốc gia hay khu vực) bao trùm tất cả các công đoạn được yêu cầu trong tiêu chuẩn này. Đặc biệt, nhà sản xuất cần thận trọng trong tất cả các giai đoạn của quá trình sản xuất nhằm giảm thiểu sự lây nhiễm có thể ảnh hưởng xấu đến hiệu quả của chất chỉ thị sinh học.

**4.1.2 Khả năng truy xuất nguồn gốc**

**4.1.2.1** Khả năng truy xuất nguồn gốc của các thành phần trong quá trình sản xuất cần được duy trì.

**4.1.2.2** Sản xuất các thành phần cần bao gồm các chất liệu cấu thành trong đó, hoặc tiếp xúc trực tiếp với dịch treo chứa vi sinh vật thử nghiệm, chất mang đã cấy hoặc bao gói trực tiếp.

**4.1.3 Yêu cầu cho sản phẩm cuối cùng**

Sản phẩm cuối cùng cần tuân theo các yêu cầu nêu ra trong tiêu chuẩn này, xem:

- a) sản xuất (Điều 5);
- b) ghi nhãn (Điều 4.3);
- c) đặc tính sức đề kháng (Điều 6.4);
- d) bảo quản và vận chuyển (Điều 4.4).

CHÚ THÍCH 1 Khuyến cáo về phương pháp sử dụng của các chất chỉ thị sinh học được nêu trong TCVN 8583 (ISO 14161).

CHÚ THÍCH 2 Có thể có các yêu cầu riêng của quốc gia và/hoặc khu vực, ví dụ trong các dược điển quốc gia hoặc khu vực khác nhau.

#### 4.1.4 Nhân sự

Các quy trình và phương pháp trong tiêu chuẩn này cần được thực hiện bởi người có kinh nghiệm trong phòng thí nghiệm và được đào tạo phù hợp (xem 4.1.1).

### 4.2 Vi sinh vật thử nghiệm

#### 4.2.1 Chủng vi sinh vật

4.2.1.1 Các vi sinh vật thử nghiệm nên là các chủng đã được xác định, thu được bằng cách nuôi cấy theo phương pháp đã được công nhận và cần được xác định bởi phương pháp thử nghiệm phù hợp.

4.2.1.2 Vi sinh vật thử nghiệm nên là chủng:

- phù hợp với việc xử lý không cần phương tiện ngăn chặn đặc biệt, không cần quy trình ngăn ngừa đặc biệt khi thao tác và không cần các yêu cầu gửi hay vận chuyển đặc biệt (ví dụ, Nguy cơ nhóm 1, WHO 1993);
- phù hợp để duy trì đặc tính đề kháng trong hạn thời gian còn hạn dùng khi vận chuyển và bảo quản theo chỉ dẫn trên bao bì.

CHÚ THÍCH Theo thông lệ, vi sinh vật thử nghiệm cho các chất chỉ thị sinh học là các vi khuẩn đơn bào, thường có nguồn gốc từ chủng *Bacillus* hoặc *Geobacillus*

4.2.1.3 Các vi sinh vật thử nghiệm không phải vi khuẩn đơn bào có thể được sử dụng nếu chúng được chứng minh là cung cấp được sức đề kháng phù hợp cho quá trình tiệt khuẩn.

#### 4.2.2 Nguồn vi sinh vật cho dịch treo

4.2.2.1 Nguồn vi sinh vật ban đầu cho mỗi lô vi sinh vật thử nghiệm nên là:

- có thể truy xuất đến môi trường nuôi cấy tham chiếu và có sẵn thông qua bộ sưu tập vi sinh vật đã được công nhận;
- xác nhận danh tính và sự tinh khiết.

4.2.2.2 Phương pháp sử dụng để duy trì nuôi cấy vi sinh vật thử nghiệm nên được thiết kế để bảo vệ chúng khỏi lây nhiễm và giảm thiểu bất cứ sự thay đổi về đặc tính vốn có của vi sinh vật thử nghiệm.

4.2.2.3 Xét nghiệm xác nhận đặc hiệu đối với từng chủng vi sinh vật thử nghiệm và cần được nhà sản xuất ghi chép và xác nhận.

#### 4.2.3 Đếm số lượng vi sinh vật thử nghiệm

4.2.3.1 Số lượng các vi sinh vật sống trong dịch treo cần được xác định theo Phụ lục A.

4.2.3.2 Nếu người sử dụng yêu cầu thông tin về chỉ số phát triển của vi sinh vật thử nghiệm, thông tin này cần được cung cấp dưới dạng tỷ lệ % của số lượng vi sinh vật thử nghiệm trên tổng số lượng vi sinh vật trực tiếp đếm được trên kính hiển vi.

### 4.3 Các thông tin cung cấp bởi nhà sản xuất (ghi nhãn)

4.3.1 Các thông tin sau cần nhà sản xuất cung cấp trên nhãn của mỗi đơn vị dịch treo, bao gói của vật liệu mang chủng và chất chỉ thị sinh học

- mã duy nhất thông qua đó có thể truy xuất được nguồn gốc của sản phẩm;
- tên của vi sinh vật thử nghiệm;
- chỉ định phù hợp của quá trình tiệt khuẩn đối với dịch treo, vật liệu mang chủng, hoặc chất chỉ thị sinh học;
- ngày hết hạn theo yêu cầu của TCVN ISO 8601, (ví dụ: năm – tháng – ngày)
- tên của nhà sản xuất, thương hiệu sản phẩm, địa chỉ hoặc các biện pháp nhận dạng khác.

Có thể sử dụng những biểu tượng đã được quốc tế công nhận (xem 4.1.3 và TCVN 6916 (ISO 15223)).

4.3.2 Các thông tin trong Bảng 1 cần được cung cấp trong bao gói trung gian của mỗi lô sản phẩm.

4.3.3 Các yêu cầu ghi nhãn có thể đạt được nhờ việc sử dụng các biểu tượng phù hợp (TCVN 6916 (ISO15223)).

**Bảng 1—Các thông tin do nhà sản xuất cung cấp**

Thông tin yêu cầu	Dịch treo	Chất mang đã cấy	Chất chỉ thị sinh học
Tên hoặc tên viết tắt của bộ sưu tập chủng vi sinh vật mà từ đó vi sinh vật thử nghiệm được lấy	Yêu cầu	Yêu cầu	Yêu cầu
Thể tích danh nghĩa của dịch treo, tính bằng ml	Yêu cầu	—	—
Quá trình làm cho sản phẩm phù hợp để sử dụng, sức đề kháng và chất mang được sử dụng để xác định sức đề kháng <sup>a</sup>	Yêu cầu	Yêu cầu	Yêu cầu
Điều kiện bảo quản cụ thể	Yêu cầu	Yêu cầu	Yêu cầu
Hướng dẫn xử lý chất thải	Yêu cầu	Yêu cầu	Yêu cầu
Hướng dẫn sử dụng đặc biệt là các số liệu về môi trường, cách nuôi cấy và các điều kiện khác được sử dụng để làm hồi phục vi sinh vật thử nghiệm sau khi được tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn	Yêu cầu	Yêu cầu	Yêu cầu
Số lượng các vi sinh vật thử nghiệm trong 1 ml (dịch treo), hoặc trong mỗi đơn vị (chất mang đã cấy hoặc chất chỉ thị sinh học) <sup>a</sup>	Yêu cầu	Yêu cầu	Yêu cầu
Số lượng đơn vị sản phẩm trong bao gói trung gian	—	Yêu cầu	Yêu cầu
Viện dẫn tiêu chuẩn này	Yêu cầu	Yêu cầu	Yêu cầu

<sup>a</sup> Phương pháp thử nghiệm được sử dụng để xác định sức đề kháng và mật độ cần được nhà sản xuất cung cấp nếu có yêu cầu.

#### **4.4 Bảo quản và vận chuyển**

4.4.1 Điều kiện bảo quản và vận chuyển đối với vi sinh vật thử nghiệm nên được duy trì sao cho dịch treo chứa vi sinh vật phù hợp các yêu cầu của tiêu chuẩn này và các phần khác của TCVN 9855 (ISO 11138) khi có liên quan.

4.4.2 Nếu chất mang có vi sinh vật được bao gói, các chất này nên được bao gói theo phương pháp không làm ảnh hưởng đến mật độ danh nghĩa và tính năng của từng chất mang đã cấy.

4.4.3 Điều kiện bảo quản và vận chuyển đối với các chất mang có vi sinh vật cần được duy trì sao cho chất mang đã cấy tuân theo các yêu cầu trong tiêu chuẩn này và các tiêu chuẩn khác của bộ TCVN 9855 (ISO 11138) khi có liên quan.

4.4.4 Các chất chỉ thị sinh học được bao gói riêng cần được bao gói trung gian để vận chuyển và bảo quản. Bao gói để vận chuyển và bảo quản cần đảm bảo các chất chỉ thị sinh học tuân theo tiêu chuẩn này và các phần khác của bộ TCVN 9855 (ISO 11138) khi có liên quan.

### **5 Các yêu cầu cụ thể khi sản xuất**

#### **5.1 Dịch treo**

5.1.1 Môi trường nuôi cấy và điều kiện nuôi cấy cần sản xuất ra dịch treo có vi sinh vật thử nghiệm đáp ứng các yêu cầu về hoạt động trong tiêu chuẩn này và các tiêu chuẩn khác của bộ TCVN 9855 (ISO 11138) khi có liên quan.

5.1.2 Môi trường treo cho dịch treo chứa vi sinh vật không được ảnh hưởng đến sự ổn định của vi sinh vật thử nghiệm và tương thích với các quy trình và vật liệu sử dụng trong sản xuất các chất mang đã cấy vi sinh vật và các chất chỉ thị sinh học.

5.1.3 Phương pháp thu hoạch và xử lý dịch treo sau đó để sử dụng cấy vào chất mang cần đảm bảo các chất tồn dư không ảnh hưởng đến hoạt động của chất mang đã cấy vi sinh vật và các chất chỉ thị sinh học.

#### **5.2 Chất mang, bao gói trực tiếp và bao gói trung gian**

5.2.1 Vật liệu chất mang và bao gói trực tiếp và trung gian không được chứa bất kỳ nguồn lây nhiễm (lý, hoá và vi khuẩn) nào có thể ảnh hưởng đến hoạt động của chất chỉ thị sinh học.

5.2.2 Chất mang, bao gói trực tiếp và trung gian và điều kiện bảo quản cụ thể cần được thiết kế sao cho đặc trưng tính năng của chất chỉ thị sinh học tuân theo các yêu cầu của tiêu chuẩn này trong suốt thời gian còn hạn dùng của sản phẩm. Nhà sản xuất cần cung cấp cho người mua thông báo về kích thước các chiều của chất mang khi được yêu cầu.

5.2.3 Trong và sau quá trình tiệt khuẩn chất mang và bao gói trực tiếp không được lưu lại hoặc giải phóng các chất có thể nhiễm vào môi trường nuôi cấy, dưới điều kiện nuôi cấy, lượng nhỏ vi khuẩn sống sót sẽ bị ức chế phát triển. Việc thử nghiệm cần tuân theo Phụ lục B.

5.2.4 Chất mang, bao gói trực tiếp và bao gói trung gian cần chịu được những tác động trong quá trình vận chuyển đến nơi sử dụng.

5.2.5 Các chất liệu thô sử dụng cho chất mang và bao gói trực tiếp cần chịu đựng được những tác động của quá trình tiệt khuẩn mà không ảnh hưởng đến đặc tính hoạt động của các chất mang đã cấy vi sinh vật hoặc chất chỉ thị sinh học. Sự tuân thủ nuôi cấy cần được đánh giá qua quan sát chất mang và bao gói trực tiếp khi tiếp xúc với các biến đổi cực đại về trị số hóa lý của quá trình tiệt khuẩn.

**CHÚ THÍCH** Tài liệu tham khảo về điều kiện tiệt khuẩn có thể tìm được trong các phần khác của TCVN 9855 (ISO 11138).

5.2.6 Điều kiện tiệt khuẩn sẽ sử dụng cần được kiểm tra bởi nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học và áp dụng để thử nghiệm khả năng ứng dụng của chất chỉ thị sinh học.

### 5.3 Chất mang đã cấy

5.3.1 Các chất mang đã cấy cần làm bằng chất liệu có thể chịu đựng được những tác động của quá trình tiệt khuẩn mà không bị biến dạng, tan chảy, ăn mòn, hoặc các hư hỏng khác có thể làm ảnh hưởng xấu đến công dụng của chất mang.

5.3.2 Chỉ một chủng vi sinh vật thử được sử dụng trong một lô chất mang đã cấy, trừ khi nhà sản xuất đã chứng minh được việc sử dụng nhiều chủng vi sinh vật không ảnh hưởng tới tính năng của vi sinh vật trong quá trình tiệt khuẩn cụ thể.

5.3.3 Trước khi cấy, chất mang nên được tiệt khuẩn theo ISO 17665-1, TCVN 7392 (ISO 11135), TCVN 7393 (ISO 11137) phần 1 đến phần 3 hoặc các phương pháp tiệt khuẩn phù hợp. Nếu tiệt khuẩn không thực hiện được, giới hạn có thể chấp nhận được về vi sinh vật tạp nhiễm của chất mang có thể được thiết lập theo ISO 11737-1 (xem Phụ lục B).

5.3.4 Các chất mang sẽ được cấy nhằm duy trì được một mật độ vi sinh vật ổn định (xem 6.3).

### 5.4 Chất chỉ thị sinh học

5.4.1 Các chất chỉ thị sinh học đã được bao gói riêng rẽ cần được chuẩn bị bằng cách đặt các chất mang đã cấy vào một bao gói trực tiếp.

5.4.2 Bao gói trực tiếp cần được đánh giá xác nhận về mục đích sử dụng (xem Phụ lục B).

5.4.3 Các tiêu chuẩn quốc gia và quốc tế phù hợp đối với bao gói nên được áp dụng (xem TCVN 7394-1 (ISO 11607-1) và TCVN 7394-2 (ISO 11607-2)).

### 5.5 Chất chỉ thị sinh học tích hợp sẵn

Tính năng của một chất chỉ thị sinh học tích hợp sẵn cần được đánh giá xác nhận, bao gồm cả khả năng của môi trường nuôi cấy trong việc thúc đẩy sự phát triển của vi sinh vật thử nghiệm sau khi trải qua quá trình tiệt khuẩn.

## 6 Xác định sức đề kháng

### 6.1 Các yêu cầu chung về sức đề kháng

6.1.1 Khả năng đề kháng của mỗi lô chất chỉ thị sinh học cần được kiểm tra để chứng minh là phù hợp với yêu cầu tính năng quy định trong tiêu chuẩn này và các phần liên quan khác của TCVN 9855 (ISO 11138).

6.1.2 Đặc trưng sức đề kháng của các chất chỉ thị sinh học cho các quá trình tiệt khuẩn không quy định trong bất kỳ phần nào của TCVN 9855 (ISO 11138) cần được xác định bằng cách sử dụng các yếu tố của điều này trong đó các điều kiện thử nghiệm cho quá trình tiệt khuẩn cần được mô tả rõ.

6.1.3 Việc đánh giá xác nhận và giám sát một số quá trình tiệt khuẩn đã được thừa nhận là có trường hợp dùng các chất chỉ thị sinh học không đáp ứng mật độ tối thiểu và/hoặc các tiêu chuẩn về sức đề kháng nêu trong TCVN 9855 (ISO 11138). Các chất chỉ thị sinh học này có thể chấp nhận được với điều kiện là:

- tất cả các yêu cầu của TCVN 9855 (ISO 11138) (bao gồm phương pháp thử nghiệm mật độ và sức đề kháng) được đáp ứng;
- Thông tin sản phẩm bao gồm thông báo rõ ràng về mật độ và sức đề kháng;
- Ghi nhãn của sản phẩm có thông tin cảnh báo rõ ràng về mật độ/ hoặc sức đề kháng (khi phù hợp) thấp hơn giá trị nêu trong phần liên quan của TCVN 9855 (ISO 11138).

6.1.4 Thử nghiệm về sức đề kháng cần bao gồm việc xác định số lượng vi sinh vật sống và xác định các đặc trưng sức đề kháng (xem 6.3 và 6.4).

6.1.5 Sức đề kháng của một chất chỉ thị sinh học có thể được nêu bởi thuật ngữ giá trị  $F_{BIO}$  (xem 3.7).

### 6.2 Vi sinh vật thử nghiệm

Vi sinh vật thử nghiệm cần được nêu cụ thể.

### 6.3 Mật độ vi sinh vật thử nghiệm

6.3.1 Số lượng vi sinh vật sống cần được xác định (xem Phụ lục A).

6.3.2 Số lượng vi sinh vật sống cần trong khoảng 50 % đến 300 % so với giá trị nhà sản xuất đưa ra khi được xác định bởi nhà sản xuất hoặc cơ quan thứ ba, trong giai đoạn còn hạn sử dụng và áp dụng phương pháp quy định bởi nhà sản xuất.

### 6.4 Đặc trưng sức đề kháng

6.4.1 Đặc trưng sức đề kháng cần được xác định bằng cách phối hợp ít nhất hai phương pháp sau:

- xác định giá trị  $D$  qua việc xây dựng một đường cong sống sót (xem Phụ lục C);

- e) xác định giá trị  $D$  bằng phương pháp phân số âm tính (xem Phụ lục D);
- f) xác định các đặc tính đáp ứng sự tồn tại/tiêu diệt (xem Phụ lục E).

6.4.2 Các giá trị thu được thông qua các phương pháp này phải nằm trong giới hạn yêu cầu trong các phần tương ứng của TCVN 9855 (ISO 11138). Ít nhất hai giá trị này phải ghi trên nhãn của các chất chỉ thị sinh học (xem 4.3).

6.4.3 Giá trị  $D$  phải nằm trong khoảng  $\pm 20\%$  so với giá trị nhà sản xuất đưa ra khi được xác định bởi nhà sản xuất, trong giai đoạn còn hạn sử dụng và áp dụng phương pháp quy định bởi nhà sản xuất.

Đường cong sống sót lý tưởng là đường cong tuyến tính và bao phủ nuôi cấy toàn bộ giới hạn bất hoạt. Trong thực tế, sai số ngoài đường cong lý tưởng có xảy ra, nhưng vẫn phải duy trì tuyến tính trong giới hạn cho phép. Việc xây dựng đường cong sống sót bằng sự liệt kê thiết lập sức đề kháng cho các mật độ sống sót lớn hơn  $5 \times 10^1$ , trong đó phương pháp phân số âm thiết lập cách tính số lượng vi sinh vật sống sót dựa trên thống kê ở dưới mức đó. Sự tương quan tốt với giá trị  $D$  tính bằng hai phương pháp trên có thể được sử dụng để khẳng định rằng không có sai số lớn so với đường cong sống sót tuyến tính.

Các phần của TCVN 9855 (ISO 11138) có thể cần các giá trị xác định khác (ví dụ giá trị  $z$  đối với các chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm [TCVN 9855-3 (ISO 11138-3)] hoặc tiệt khuẩn bằng nhiệt khô [TCVN 9855-4 (ISO 11138-4)]).

Đặc trưng sức đề kháng được nêu rõ trong tiêu chuẩn này và bất kỳ phần nào của TCVN 9855 (ISO 11138) áp dụng cho các điều kiện thử nghiệm cụ thể được nêu trong các phần đó.

6.4.4 Đường cong sống sót là một đường cong bán logarit của  $\log_{10}$  của số lượng vi sinh vật sống được xét nghiệm so với thời gian. Đường cong này nên tuyến tính với hệ số tương quan ít nhất là 0,8 (xem Phụ lục C).

## 6.5 Điều kiện thử nghiệm

Đặc trưng sức đề kháng nên được xác định bằng cách sử dụng các điều kiện thử nghiệm quy định bởi nhà sản xuất. Xem Bảng 2.

Bảng 2—Số lượng mẫu thử tối thiểu tùy theo phương pháp

Phương pháp thử nghiệm theo TCVN 9855-1 (ISO 11138-1)	Số lượng tối thiểu của mẫu thử nghiệm	Số lượng tối thiểu của điều kiện tiếp xúc	Tổng số lượng tối thiểu của mẫu thử nghiệm
Số lượng vi sinh vật sống được thử nghiệm ban đầu <sup>a</sup>	4	—	4
Phụ lục C Phương pháp đường cong sống sót.	4	5	20
Phụ lục D Phương pháp phân số âm	20	5 <sup>b</sup>	100 <sup>b</sup>
Phụ lục E Cửa sổ tồn tại – tiêu diệt	50	2	100
Số lượng tối thiểu phụ thuộc vào sự lựa chọn phối hợp các phương pháp.			124 hoặc 204
CHÚ THÍCH Điều kiện thông thường nhất cho mỗi phương pháp tiệt khuẩn cụ thể đã được xây dựng theo thời gian và được trình bày trong các phần của TCVN 9855 (ISO11138).			
<sup>a</sup> Số lượng sống của chất mang đã cấy chưa xử lý hoặc chất chỉ thị sinh học.			
<sup>b</sup> Các điều kiện thử nghiệm khi phơi nhiễm với thời gian $t_0$ (xem Bảng D.1) không được sử dụng trong tính toán, nhưng là điều kiện để chấp nhận kết quả có giá trị.			

## 7 Điều kiện nuôi cấy

### 7.1 Tủ cấy

7.1.1 Tủ cấy cần được đặt chế độ và giám sát đảm bảo cung cấp điều kiện nuôi cấy cụ thể.

7.1.2 Ngoài việc theo dõi nhiệt độ thường quy, sự phân bố nhiệt độ trong tủ cấy cũng cần được đánh giá xác nhận.

### 7.2 Môi trường nuôi cấy

7.2.1 Môi trường nuôi cấy cần được xác định và chứng minh sự hỗ trợ tăng trưởng của một lần chủng ít hơn 100 vi sinh vật.

7.2.2 Ghi nhãn cần có các thông tin về điều kiện nuôi cấy sau khi tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn (xem 4.3).

7.2.3 Môi trường nuôi cấy cần được kiểm định nhằm đảm bảo là nó có thể trung hoà các chất tiệt khuẩn tồn dư, các chất có thể ảnh hưởng tới sự sống của các vi sinh vật (xem 5.2.3).

### 7.3 Nuôi cấy

7.3.1 Thời gian và nhiệt độ nuôi cấy cần được kiểm định.

7.3.2 Các nhà sản xuất cần cung cấp hướng dẫn nuôi cấy (xem Bảng 1). Một giai đoạn nuôi cấy thường được công nhận là bảy ngày để cho các quá trình tiệt khuẩn đã được thiết lập, như nhiệt ẩm và etylen oxit, dùng các vi sinh vật có đặc tính đã được xác định rõ như *Geobacillus stearothermophilus* và *Bacillus atrophaeus*. Khi không có đủ dữ liệu để hỗ trợ giai đoạn nuôi cấy tham chiếu bảy ngày cho một phương pháp tiệt khuẩn mới, ít nhất 14 ngày nên cần được dùng như một giai đoạn nuôi cấy tham chiếu làm cơ sở cho việc kiểm định.

CHÚ THÍCH Các quốc gia hoặc khu vực có thể có yêu cầu riêng cho kiểm định giai đoạn nuôi cấy.



**Phụ lục A**

(quy định)

**Xác định số vi sinh vật sống****A.1 Tổng quan**

**A.1.1** Các kỹ thuật đếm để xác định số lượng vi sinh vật sống trong dịch treo trên vật liệu mang chủng, hoặc từ các chất chỉ thị sinh học đã được bao gói, bằng cách đếm số đơn vị khuẩn lạc hình thành rõ rệt (đơn vị CFUs). Phương pháp được sử dụng khi số lượng mong đợi của các vi sinh vật thử nghiệm hồi phục trên  $5 \times 10^1$  đơn vị CFUs.

**A.1.2** Các sản phẩm liên quan cần được kiểm tra vi sinh vật hồi phục theo A.2 và A.4. Phương pháp này áp dụng cho cả các mẫu thử đã được xử lý và chưa được xử lý và có thể được sử dụng để xác định số vi sinh vật sống ban đầu (mẫu chưa xử lý) cũng như việc xác định giá trị D dùng trong phương pháp đường cong sống sót (các mẫu chưa xử lý).

**A.1.3** Các phương pháp đếm thay thế đã được xác nhận là tương đương với kỹ thuật cấy trực tiếp bệnh phẩm có thể được sử dụng.

**A.2 Số lượng mẫu thử tối thiểu**

Cần dùng số lượng tối thiểu là bốn mẫu từ mỗi lô hoặc mỗi lần tiếp xúc.

**A.3 Chuẩn bị mẫu và phương pháp nuôi cấy**

**A.3.1** Các mẫu thử nghiệm cần được đặt trong môi trường treo có thể tích phù hợp. Vi sinh vật thử nghiệm cần được tách rời từ mẫu thử bằng các kỹ thuật đã được kiểm định (ví dụ, ngâm với hạt thủy tinh, nghiền và/hoặc trộn trong máy khuấy đồng hoá và/hoặc máy trộn, lắc xoáy, trộn siêu âm hoặc các phương pháp phù hợp khác (xem ISO 11737-1).

**A.3.2** Nồng độ các vi sinh vật trong dịch treo cần được điều chỉnh bằng pha loãng, nếu cần, trong dung dịch pha loãng phù hợp. Bất cứ khi nào có thể, số lượng các đơn vị khuẩn lạc hình thành (CFU) cần nằm trong một phạm vi nhất định đối với phương pháp được sử dụng.

Đối với nuôi cấy trong thạch agar lỏng hoặc dàn trên bề mặt thạch agar đặc với kích thước của đĩa Petri thông thường, số lượng khuẩn lạc nằm trong khoảng 30 đến 300 được coi là chính xác nhất.

**A.3.3** Cần sử dụng một phương pháp phù hợp đếm số vi sinh vật sống.

Các phương pháp phù hợp có thể bao gồm kỹ thuật màng lọc, cấy trực tiếp trên môi trường thạch bán đặc hoặc trộn với môi trường thạch lỏng (ISO 11737-1).

**A.3.4** Nhà sản xuất chất chỉ thị sinh học cần xác định hoặc cung cấp sẵn một môi trường phù hợp cho sự hồi phục của vi sinh vật thử nghiệm và/hoặc số liệu đầy đủ và hướng dẫn để chuẩn bị một môi trường như vậy.

#### **A.4 Nuôi cấy và đếm**

**A.4.1** Các mẫu nuôi cấy hoặc các màng lọc cần được nuôi cấy ở các nhiệt độ và thời gian quy định bởi nhà sản xuất.

Nói chung, các giai đoạn nuôi cấy và nhiệt độ là 55 °C đến 60 °C trong thời gian không dưới 48 h đối với các vi sinh vật ưa nhiệt và 30 °C đến 37 °C trong thời gian không dưới 48 h đối với các vi sinh vật ưa ấm.

**CHÚ THÍCH** Việc khử ẩm môi trường nuôi cấy có thể có tác động ngược đối với sự phát triển trong nhiệt độ nuôi cấy cao.

**A.4.2** Sau giai đoạn nuôi cấy phù hợp, cần đếm số đơn vị khuẩn lạc hình thành trên đĩa hoặc trên màng lọc và cần tính toán số lượng trung bình các vi sinh vật thử nghiệm hồi phục trong mỗi đơn vị.

## **Phụ lục B**

(quy định)

### **Xác định sự ức chế tăng trưởng của vi sinh vật bằng các chất mang và chất liệu bao gói trực tiếp khi tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn**

#### **B.1 Tổng quan**

Phương pháp này được sử dụng để xác định tính phù hợp của chất mang và các chất liệu bao gói trực tiếp sử dụng cho quá trình tiệt khuẩn bằng cách xác định các tác dụng ức chế của các chất liệu này đối với sự phát triển của các vi sinh vật thử nghiệm sau khi được tiệt khuẩn. Tính chất lý học của các chất liệu này cần được thử nghiệm tính phù hợp. Phương pháp thử được đề cập trong các phần của bộ TCVN 9855 (ISO 11138). Đặc điểm của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được trình bày trong ISO 18472.

#### **B.2 Chất liệu**

**B.2.1** Dịch treo chứa cùng chủng vi sinh vật cần được chuẩn bị giống theo cách mà các vi sinh vật được dùng để cấy vào chất mang. Dịch treo cần chứa một mật độ vi sinh vật đã được biết và được xác định bởi đếm số lượng sống, nhằm cho phép cung cấp các mẫu thử có chứa mật độ có dưới 100 vi sinh vật sống.

**B.2.2** Tủ cấy cần được đặt chế độ và được giám sát đảm bảo cung cấp điều kiện nuôi cấy cụ thể.

**B.2.3** Môi trường nuôi cấy cần tuân theo các điều kiện nuôi cấy.

**B.2.4** Các mẫu thử cần là các chất mang chưa cấy, hoặc các chất liệu bao gói trực tiếp chuẩn bị theo B.3.

#### **B.3 Phương pháp**

**B.3.1** Chuẩn bị chín dụng cụ chứa môi trường nuôi cấy và cân bằng nhiệt độ nuôi cấy phù hợp với các điều kiện nuôi cấy. Sử dụng thể tích môi trường nuôi cấy tương tự như đã được sử dụng cho dịch treo, chất mang đã cấy hoặc chất chỉ thị sinh học.

**B.3.2** Lấy một mẫu đại diện của 12 chất mang đã cấy và chia các chất mang ra làm sáu nhóm, mỗi nhóm hai chất. Các chất mang cần được bao gói bằng chất liệu được sử dụng trong sản xuất chất chỉ thị sinh học.

**B.3.3** Lấy ba nhóm chất mang từ mẫu lấy trong B.3.2, mỗi nhóm bao gồm hai chất mang và cho chúng tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn.

**B.3.4** Đặt điều kiện vận hành của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng tới giá trị được nêu trong các phần tương ứng của của bộ TCVN 9855 (ISO 11138).

**B.3.5** Khi kết thúc quá trình, mờ chất mang trong khi vẫn giữ vô khuẩn và chuyển vào môi trường nuôi cấy mà không đem xử lý ngay. Đặt nội dung của một nhóm trong hai chất mang vào ba dụng cụ chứa (mỗi chất mang một dụng cụ chứa) đã được cân bằng về nhiệt độ nuôi cấy trước đó (xem B.3.1). Ghi lại thời gian cần thiết để hoàn thành quá trình chuyển chất mang.

**B.3.6** Môi trường nuôi cấy chứa các mẫu chất mang ở nhiệt độ xác định trong vòng  $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$  cho phép các chất ức chế giải phóng từ chất mang. Lấy môi trường nuôi cấy ra khỏi tủ cấy và cấy vào mỗi dụng cụ chứa một thể tích dịch treo chứa vi sinh vật đã được tính toán là chứa dưới 100 vi sinh vật thử nghiệm. Đặt môi trường đã được cấy trở lại vào tủ cấy. Nuôi cấy trong thời gian đã được xác định để hồi phục các chất chỉ thị sinh học trong điều kiện bình thường khi sử dụng.

**B.3.7** Kiểm soát được tiến hành bằng cách chuyển ba nhóm mẫu của hai chất mang không tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn, sang ba hộp chứa còn lại có môi trường nuôi cấy. Nuôi cấy các hộp này trong vòng  $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$ . Sau đó cấy mỗi hộp với dưới 100 vi sinh vật và nuôi cấy chúng trong giai đoạn cụ thể theo cách được mô tả trong B.3.6.

**B.3.8** Việc xác định danh tính của các vi sinh vật có thể được tiến hành nếu việc sử dụng chất mang không vô trùng được nghi ngờ làm ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm.

**B.3.9** Đối với việc kiểm soát môi trường tăng trưởng, nuôi cấy ba hộp chứa môi trường nuôi cấy, không có chất mang trong vòng  $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$ . Sau đó cấy vào mỗi hộp chứa dưới 100 vi sinh vật thử nghiệm và nuôi cấy trong giai đoạn phù hợp như cách được mô tả trong B.3.6.

**B.3.10** Khi kết thúc giai đoạn nuôi cấy, lấy tất cả chín hộp chứa ra khỏi tủ cấy và kiểm tra số lượng vi sinh vật sống theo phương pháp nhà sản xuất đưa ra trong điều kiện sử dụng bình thường.

**B.3.11** Báo cáo kết quả là sự "tăng trưởng" hoặc "không tăng trưởng" của vi sinh vật thử nghiệm.

## **B.4 Diễn giải kết quả**

**B.4.1** Nếu hiện tượng "không tăng trưởng" xảy ra ở một hoặc nhiều hơn môi trường chứng, kỹ thuật thử nghiệm cần được coi là không có giá trị.

**CHÚ THÍCH** Nếu hiện tượng "không tăng trưởng" xảy ra ở các môi trường chứng có thể là dấu hiệu thất bại trong việc kiểm soát mật độ vi sinh vật thử nghiệm giảm hoạt tính hoặc điều kiện hồi phục không phù hợp (ví dụ: môi trường nuôi cấy, thời gian nuôi cấy, nhiệt độ nuôi cấy...)

**B.4.2** Nếu hiện tượng "không tăng trưởng" xảy ra ở một hoặc nhiều chất mang chứng, chất mang cần được coi là không phù hợp cho sản xuất chất mang đã cấy hoặc chất chỉ thị sinh học.

**CHÚ THÍCH** Nếu hiện tượng "không tăng trưởng" xảy ra ở môi trường chứng có thể cho thấy rằng chất liệu chất mang ức chế sự phát triển của vi sinh vật thử nghiệm.

B.4.3 Nếu hiện tượng "không tăng trưởng" xảy ra ở một hoặc nhiều thử nghiệm cho chất mang tiếp xúc với quá trình tiệt khuẩn, chất mang được coi là không phù hợp.

**CHÚ THÍCH** Hiện tượng "không tăng trưởng" có thể do sự hấp thu mạnh chất tiệt khuẩn hoặc các biến đổi suy thoái của chất liệu chất mang trong quá trình tiệt khuẩn.

## **B.5 Xác định sự ức chế phát triển do chất liệu bao gói trực tiếp**

**B.5.1** Các mẫu chất liệu bao gói trực tiếp cần được thử nghiệm theo cách tương tự như thử nghiệm chất liệu của chất mang (ví dụ: các bước sau được nêu ra trong mục này, sử dụng cùng chất liệu bao gói trực tiếp như trong mẫu thử nghiệm).

**B.5.2** Khi thực hiện thử nghiệm, cần sử dụng mẫu của chất liệu bao gói trực tiếp có kích thước rộng gấp đôi diện tích bình thường tiếp xúc với chất mang đã cấy. Đối với các chất chỉ thị sinh học tích hợp sẵn, kích thước cần tương đương với diện tích tiếp xúc với môi trường hồi phục. Các mẫu thử nghiệm cần được nhúng vào môi trường nuôi cấy.

## Phụ lục C

(quy định)

### Xác định giá trị D bằng phương pháp đường cong sống sót

#### C.1 Tổng quan

Phương pháp này xác định số lượng vi sinh vật sống sót bằng cách đếm trực tiếp số đơn vị khuẩn lạc được hình thành. Phương pháp này được trích dẫn như là "phương pháp đếm trực tiếp". Xem Phụ lục A.

CHÚ THÍCH Phương pháp trên thực tế có giới hạn dưới xấp xỉ  $5 \times 10^1$  đơn vị khuẩn lạc (CFU).

#### C.2 Chất liệu

C.2.1 Các mẫu thử nghiệm đại diện cho dịch treo chứa bào tử, chất mang đã cấy, hoặc các chất chỉ thị đã bao gói cần được cung cấp cùng với chất liệu.

CHÚ THÍCH Phương pháp thử nghiệm được trình bày trong các phần sau của TCVN 9855 (ISO 11138). Đặc điểm kỹ thuật của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được nêu trong ISO 18472.

C.2.2 Tủ cấy được cần được đặt chế độ và được giám sát đảm bảo cung cấp nhiệt độ yêu cầu của điều kiện nuôi cấy.

C.2.3 Môi trường nuôi cấy phù hợp với điều kiện nuôi cấy cần được cung cấp kèm trong các chất liệu.

#### C.3 Quy trình

C.3.1 Các mẫu thử cần tuân theo các điều kiện tiếp xúc quy định. Phạm vi tiếp xúc cần được nêu rõ ràng. Xem Bảng 2.

C.3.2 Tối thiểu cần có 5 lần tiếp xúc bao gồm:

a) Một lần tiếp xúc trong đó mẫu không được tiếp xúc với chất tiết khuẩn (ví dụ, thời gian tiếp xúc bằng 0).

CHÚ THÍCH Chất tiết khuẩn có thể không được đưa vào hoặc được thay thế bằng khí hoặc môi trường tro.

b) Ít nhất một lần tiếp xúc trong đó mật độ vi sinh vật sống được giảm tới 0,01 % của số lượng cấy ban đầu (giảm 4 log<sub>10</sub>).

c) Tối thiểu có ba lần tiếp xúc theo các thông số giữa lần tiếp xúc a) và lần tiếp xúc b) nêu trên.

C.3.3 Cần dùng không dưới bốn mẫu thử cho mỗi lần tiếp xúc trong mỗi lần xác định. Sử dụng số lần tương tự cho mỗi lần tiếp xúc lặp lại.

C.3.4 Nếu chất tiết khuẩn để lại cặn trong hoặc trên mỗi mẫu thử, cặn cần được trung hoà càng nhanh càng tốt để khỏi ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. Nếu cần sử dụng kỹ thuật trung hoà, kỹ thuật này cần được kiểm định.

**C.3.5** Trong vòng 2 h của mỗi lần tiếp xúc, các mẫu thử cần được xử lý để loại bỏ các vi sinh vật thử nghiệm ra khỏi chất mang và cần đếm số lượng sống của mẫu thử (xem Phụ lục A) sử dụng điều kiện nuôi cấy và phương pháp đề ra bởi nhà sản xuất để phục hồi trong điều kiện sử dụng bình thường.

**C.3.6** Các dịch treo cần được điều chỉnh trong dịch pha loãng vô khuẩn phù hợp. Đối với nuôi cấy bằng cách rớt thạch agar lỏng hoặc dàn trên thạch agar đặc trong đĩa Petri có kích thước thông thường, số lượng các đơn vị khuẩn lạc hình thành trong khoảng 30 đến 300 thì được coi là có giá trị thống kê.

**C.3.7** Sử dụng tất cả các số liệu có được, vẽ biểu đồ  $\log_{10}$  của mật độ sống sót theo thời gian tính bằng phút hoặc mức liều và xác định đồ thị tuyến tính phù hợp nhất bằng phân tích hồi quy theo phương pháp bình phương nhỏ nhất. Các điểm số liệu sống sót trong vòng 0,5 logarit của mật độ ban đầu cần được loại ra khỏi phân tích hồi quy. Tính nghịch đảo của độ dốc của biểu đồ đường thẳng có được, giá trị này bằng giá trị D tính bằng phút tại các điều kiện tiếp xúc đã nêu.

a) Độ dốc của đồ thị tuyến tính phù hợp nhất được tính theo công thức sau:

$$m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)}$$

trong đó

$m$  là độ dốc của đồ thị tuyến tính phù hợp nhất;

$n$  là số lượng các điểm dữ liệu;

$$G = \sum [t(\log_{10} y)]$$

$$A = \sum (t)$$

$$B = \sum (\log_{10} y)$$

$$C = \sum (t^2)$$

Số liệu cần thiết để tính toán được nêu trong Bảng C.1.

Bảng C.1— Ví dụ về các số liệu thu thập cho phân tích hồi quy

Mật độ hồi phục <sup>a</sup> = y	Thời gian tiếp xúc (phút)=t	$\log_{10}y$	$t^2$	$t(\log_{10}y)$	$(\log_{10}y)^2$
$y_1$	$t_1 = 0,0$	$\log_{10}y_1$	$(t_1^2) = 0$	$t_1(\log_{10}y_1) = 0$	$(\log_{10}y_1)^2$
$y_2$	$t_2$	$\log_{10}y_2$	$(t_2^2)$	$t_2(\log_{10}y_2)$	$(\log_{10}y_2)^2$
$y_3$	$t_3$	$\log_{10}y_3$	$(t_3^2)$	$t_3(\log_{10}y_3)$	$(\log_{10}y_3)^2$
$y_4$	$t_4$	$\log_{10}y_4$	$(t_4^2)$	$t_4(\log_{10}y_4)$	$(\log_{10}y_4)^2$
$y_5$	$t_5$	$\log_{10}y_5$	$(t_5^2)$	$t_5(\log_{10}y_5)$	$(\log_{10}y_5)^2$
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \log_{10} y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i^2)$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i(\log_{10} y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} (\log_{10} y_i)^2$
Biến số quy định	A	B	C	G	E

<sup>a</sup> Như ở điều C.3.7, các điểm dữ liệu nằm trong 0,5 logarit của  $y_1$  không được đưa vào phân tích hồi quy.

b) Ví dụ về cách tính toán độ dốc của đồ thị tuyến tính phù hợp nhất được trình bày trong Bảng C.2 dưới đây.

Bảng C.2— Các ví dụ về tính toán độ dốc

Mật độ hồi phục <sup>a</sup> = y	Thời gian tiếp xúc (phút)=t	$\log_{10}y$	$t^2$	$t(\log_{10}y)$	$(\log_{10}y)^2$
$y_1 = 2,5 \times 10^6$	$t_1 = 0,0$	$\log_{10}y_1 = 6,3979$	$(t_1^2) = 0$	$t_1(\log_{10}y_1) = 0$	$(\log_{10}y_1)^2 = 40,9331$
$y_2 = 3,4 \times 10^5$	$t_2 = 2,0$	$\log_{10}y_2 = 5,5315$	$(t_2^2) = 4$	$t_2(\log_{10}y_2) = 11,0630$	$(\log_{10}y_2)^2 = 30,5975$
$y_3 = 3,1 \times 10^4$	$t_3 = 4,0$	$\log_{10}y_3 = 4,4914$	$(t_3^2) = 16$	$t_3(\log_{10}y_3) = 17,9656$	$(\log_{10}y_3)^2 = 20,1727$
$y_4 = 1,7 \times 10^3$	$t_4 = 6,0$	$\log_{10}y_4 = 3,2304$	$(t_4^2) = 36$	$t_4(\log_{10}y_4) = 19,3824$	$(\log_{10}y_4)^2 = 10,4355$
$y_5 = 1,9 \times 10^2$	$t_5 = 8,0$	$\log_{10}y_5 = 2,2788$	$(t_5^2) = 64$	$t_5(\log_{10}y_5) = 18,2304$	$(\log_{10}y_5)^2 = 5,1929$
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \log_{10} y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i^2)$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} [t_i(\log_{10} y_i)]$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} (\log_{10} y_i)^2$
Biến số quy định	A=20	B= 21,9300	C=120	G=66,6414	E= 107,3317

<sup>a</sup> Như ở điều C.3.7, các điểm dữ liệu nằm trong 0,5 logarit của  $y_1$  không được đưa vào phân tích hồi quy.



$$m = \frac{(nG) - (AB)}{(nC) - (A^2)}$$

$$m = \frac{[(5)(66,6414)] - [(20)(21,9300)]}{[(5)(120)] - (20^2)}$$

$$m = \frac{(333,2070) - (438,6000)}{(600) - (400)}$$

$$m = \frac{-105,3930}{200}$$

$$m = -0,5270$$

c) Giá trị  $D$  bằng nghịch đảo âm của độ dốc và được tính theo công thức sau:

$$\text{Giá trị } D = -1 \frac{1}{m}$$

Sử dụng cách tính toán độ dốc trên, có kết quả giá trị  $D$  là:

$$D = -1 \left( \frac{1}{-0,527} \right) = 1,8975 \text{ min (làm tròn tới một số thập phân } D=1,9 \text{ min)}$$

**C.3.8** Giá trị có được của hệ số tương quan đối với độ tuyến tính của biểu đồ sống sót không nhỏ hơn 0,8.

a) Hệ số tương quan đối với độ tuyến tính của biểu đồ sống sót được tính toán theo công thức sau:

$$r^2 = \frac{\{(G) - [(A)(B/n)]\}^2}{[(C) - (A^2/n)][(E) - (B^2/n)]}$$

trong đó tất cả các biến đã được định nghĩa trong C.3.7a) và  $E = \sum (\log_{10} y)^2$

b) Ví dụ các tính toán hệ số tương quan đối với độ tuyến tính của biểu đồ sống sót:

Sử dụng các giá trị từ Bảng C.2:

$$r^2 = \frac{\{(66,6414) - [(20)(21,930/5)]\}^2}{[(120) - (20^2/5)][(107,3317) - (21,9300^2/5)]}$$

$$r^2 = \frac{\{(66,6414) - [(87,7200)]\}^2}{[(120) - (80)][(107,3317) - (96,1850)]} = \frac{[(-21,0786)]^2}{[(40)][(11,1467)]} = \frac{444,3074}{445,8680} = 0,9965$$

## Phụ lục D

(quy định)

### Giá trị D tính theo phương pháp phân số âm

#### D.1 Tổng quan

D.1.1 Phương pháp này xác định số lượng vi sinh vật sống sót bằng cách đếm trực tiếp dựa trên số lượng vi sinh vật có thể hồi phục được xác định qua quan sát sự phát triển trong dịch môi trường nuôi cấy. Phương pháp này được gọi là "Phân tích phân số âm" là phương pháp trong đó một phần của mẫu thử không mọc (không phát triển) (phạm vi phân số âm) và việc tính toán dựa trên kết quả thu được với số liệu này. "Phân tích chết toàn phần" cũng là một phương pháp phân số âm trong đó tất cả các mẫu thử không mọc và sự tính toán dựa trên kết quả thu được theo yêu cầu này. Phương pháp được áp dụng khi số lượng vi sinh vật hồi phục dưới  $5 \times 10^6$  đơn vị khuẩn lạc hình thành/đơn vị đo.

D.1.2 Quy trình Holcomb-Spearman-Karber (xem D.3.1) và Limited-Holcomb-Spearman-Karber (xem D.3.2) cần các lần tiếp xúc thành công kéo dài trong phạm vi phân số âm.

CHÚ THÍCH Phương pháp khác có thể được áp dụng. Đặc biệt khi cửa sổ tồn tại - tiêu diệt đã được biết. Một phương pháp thay thế tương tự là phương pháp Stumbo-Murphy-Cochran (xem D.3.3).

D.1.3 Các mẫu thử cần tuân theo các điều kiện tiếp xúc đã định với tất cả các thông số của quá trình xử lý, ngoại trừ thời gian, vẫn nằm trong cửa sổ đã định (trạng thái ổn định). Khi các thông số của quá trình xử lý được chấp nhận là hẹp, thời gian được ký hiệu là "T". Khi các thông số của quá trình xử lý quá rộng không được coi là ổn định, các phương pháp sát nhập được sử dụng để tính thời gian tương đương "U". Cả hai thuật ngữ này đều được nêu trong phần xem xét tài liệu.

D.1.4 Số lượng các mẫu tiếp xúc,  $n$ , trong mỗi lần tiếp xúc và các khoảng cách giữa các lần tiếp xúc liên tiếp,  $d$ , cả hai đều tác động đến độ tin cậy của thử nghiệm.

#### D.2 Chất liệu

D.2.1 Các mẫu thử cần đại diện cho dịch treo chứa bào tử, chất mang đã cấy, hoặc các chất chỉ thị sinh học đã được bao gói.

D.2.2 Sử dụng thiết bị đo các tổ hợp đối chứng tương ứng.

CHÚ THÍCH Các phương pháp được nêu trong các phần sau của TCVN 9855 (ISO 11138). Đặc điểm kỹ thuật của các thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được nêu trong tiêu chuẩn của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng (ISO 18472).

D.2.3 Tủ cấy cần được đặt chế độ cung cấp, có giám sát để khẳng định nhiệt độ như yêu cầu của điều kiện nuôi cấy.

D.2.4 Môi trường nuôi cấy cần phù hợp với các tiêu chuẩn của điều kiện nuôi cấy.

## D.3 Các phương pháp

### D.3.1 Quy trình Holcomb-Spearman-Karber (HSKP)

#### D.3.1.1 Giới thiệu

**D.3.1.1.1** Các mẫu thử cần tuân theo các lần tiếp xúc đã được phân độ theo điều kiện tiếp đã định với tất cả các thông số của quá trình xử lý, ngoại trừ thời gian là không đổi. Tổng số mẫu thử không được dưới 100. Số lượng tối thiểu là 20 bản sao cần được áp dụng cho mỗi lần tiếp xúc.

**D.3.1.1.2** Cần sử dụng tối thiểu năm điều kiện tiếp xúc bao gồm ít nhất một bộ mẫu thử trong đó tất cả các mẫu đều mọc (phát triển), hai bộ mẫu thử trong đó một phần của các mẫu thử mọc và hai bộ mẫu thử, từ các lần tiếp xúc kế tiếp, không mọc (không phát triển).

**CHÚ THÍCH** Yêu cầu chi tiết đối với các thông số xử lý của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được trình bày trong các phần của TCVN 9855 (ISO 11138).

**D.3.1.1.3** Nếu chất tiết khuẩn để lại cặn trong hoặc trên các mẫu thử, cặn cần được trung hoà càng nhanh càng tốt để khỏi ảnh hưởng đến kết quả thử nghiệm. Nếu sử dụng kỹ thuật trung hoà, kỹ thuật này cần được kiểm định.

**D.3.1.1.4** Các mẫu cần được nuôi cấy sau khi đã cho tiếp xúc theo phương pháp chỉ định bởi nhà sản xuất.

**D.3.1.1.5** Mỗi chất mang đã cấy được chuyển vô khuẩn sang ống nghiệm chứa một thể tích môi trường nuôi cấy phù hợp. Thể tích của môi trường nuôi cấy tương tự cho mỗi lần lặp lại. Nếu môi trường nuôi cấy được nhà sản xuất cung cấp kèm theo như là một phần không tách rời của chất chỉ thị sinh học, các hướng dẫn nuôi cấy của nhà sản xuất cần phải được tuân thủ. Nhà sản xuất các chất chỉ thị sinh học cần xác định hoặc cung cấp sẵn một môi trường để hồi phục phù hợp và/hoặc đầy đủ các dữ liệu để chuẩn bị một môi trường tương tự (xem thêm 4.3).

**D.3.1.1.6** Mẫu thử cần được nuôi cấy theo phương pháp chỉ định bởi nhà sản xuất, các mẫu cần được kiểm tra sau giai đoạn nuôi cấy như khuyến cáo bởi nhà sản xuất hoặc sau giai đoạn nuôi cấy đã được xác nhận (xem 7.3). Sự phát triển (mọc) của các vi sinh vật thử nghiệm có thể xác định qua hiện tượng đục của môi trường nước thịt, mọc trên bề mặt của nước thịt, hoặc lắng xuống đáy của ống nghiệm, phụ thuộc vào đặc điểm của vi sinh vật thử nghiệm. Nếu môi trường nuôi cấy là một phần không tách rời của chất chỉ thị sinh học, ví dụ các chất chỉ thị sinh học tích hợp sẵn, sự phát triển hoặc không phát triển của vi sinh vật thử nghiệm cần được diễn giải phù hợp với hướng dẫn của nhà sản xuất.

Sự phát triển của vi sinh vật trong chất chỉ thị sinh học tích hợp sẵn có thể được chỉ thị bởi sự thay đổi màu pH.

**D.3.1.1.7** Các kết quả được ghi như là tỷ số của chất mang được cấy với số vi sinh vật không hồi phục trên tổng số chất mang được thử nghiệm ở mỗi lần tiếp xúc dưới mức gây chết.

### D.3.1.2 Cách tính toán theo phương pháp HSKP

D.3.1.2.1 Tính toán dựa trên tối thiểu là 5 điều kiện tiếp xúc và cần bao gồm ít nhất:

- Một bộ mẫu thử trong đó tất cả các mẫu thử đều mọc;
- Hai bộ mẫu thử trong đó một phần của các mẫu thử mọc;
- Hai bộ mẫu thử, từ các lần tiếp xúc kế tiếp, không mọc (xem Bảng D.1).

CHÚ THÍCH Phương pháp HSKP tương tự như phương pháp Limited Holcomb-Spearman-Karber (xem D.3.2), ngoại trừ việc phương pháp này sử dụng một công thức chung không giới hạn số lần lặp lại tương tự ở mỗi điều kiện tiếp xúc hoặc có khoảng thời gian không đổi giữa các lần tiếp xúc.

D.3.1.2.2 Giá trị D trung bình được tính toán theo công thức sau:

$$D = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

trong đó

$$U_{HSK} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i$$

$N_0$  là số sống trung bình đối với mỗi chất chỉ thị được xác định bởi phương pháp đếm tổng số sống (xem Phụ lục A).

Số liệu cần cho việc tính toán được trình bày trong Bảng D.1.

**Bảng D.1— Ví dụ các số liệu thu thập cho phương pháp HSKP**

Thời gian tiếp xúc với chất khử khuẩn	Số lượng mẫu thử tiếp xúc	Số lượng mẫu thử không có dấu hiệu phát triển
$t$	$n$	$r$
$t_1(U_1)$	$n_1$	$r_1 (r=0)^a$
$t_2$	$n_2$	$r_2$
$t_3$	$n_3$	$r_3$
$t_4$	$n_4$	$r_4$
$t_5(U_{k-1})$	$n_5$	$r_5$
$t_6(U_k)$	$n_6$	$r_6 (r=n_6)$
$t_7$	$n_7$	$r_7 (r=n_7)^a$

CHÚ THÍCH  $t_1$  được định nghĩa là thời gian tiếp xúc dài nhất với chất diệt khuẩn trong bộ tiếp xúc mà tất cả các mẫu thử đều mọc. Thời gian tiếp xúc  $t_2$  đến  $t_5$  là các lần tăng tiếp xúc trong phần phân số âm. Thời gian tiếp xúc  $t_6$  và  $t_7$  là hai lần tiếp xúc liên tiếp mà tất cả các mẫu thử đều không mọc.

<sup>a</sup> Thử nghiệm chỉ có giá trị nếu không có đơn vị nào âm tính, ví dụ không mẫu thử nào âm tính ( $r=0$ ), với tất cả các đơn vị có mọc ở lần tiếp xúc trước  $t_1$  và tất cả các mẫu thử âm tính ( $r=n_7$ ), ví dụ không mẫu nào mọc ở lần tiếp xúc sau thời gian  $t_6$ .

D.3.1.2.3 Thời gian tiếp xúc với chất khử khuẩn,  $t_1$  đến  $t_6$ , yếu tố  $\chi$  và  $\gamma$  được tính toán như sau:

$$x_i = \frac{t_i + t(i+1)}{2}$$

$$\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1} - \frac{r_i}{n_i}$$

trong đó

$r_i$  = số lượng của mẫu thử nghiệm không có biểu hiện của sự phát triển trong khoảng thời gian tiếp xúc  $t_i$ ;

$n_i$  = số lượng tiếp xúc trong khoảng thời gian tiếp xúc  $t_i$ .

Tại thời điểm  $t_i$ , tất cả các mẫu thử mọc vì vậy  $\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1}$

Từ cách tính các giá trị  $\chi_i$  và  $\gamma_i$  như trên, giá trị  $U_i$  có thể được tính cho mỗi lần tiếp xúc,  $t_i$ , như sau:

$$U_i = \chi_i \gamma_i$$

D.3.1.2.4 Thời gian trung bình đạt vô khuẩn,  $U_{HSK}$ , từ bất kỳ một mẫu thử nào có thể được tính là tổng của  $U_i$  cho mỗi thời gian tiếp xúc từ  $t_1$  đến  $t_6$ :

$$U_{HSK} = \sum_{i=1}^{i=6} U_i$$

D.3.1.2.5 Khi khoảng cách giữa các lần tiếp xúc,  $d$ , là không đổi và có cùng một số mẫu thử,  $n$ , được sử dụng ở mỗi lần tiếp xúc, thời gian trung bình đạt vô khuẩn có thể được tính theo công thức sau:

$$U_{HSK} = U_K - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{i=6} r_i$$

D.3.1.2.6 Giá trị  $D$  trung bình,  $\bar{D}$ , có thể được tính toán theo công thức sau:

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

CHÚ THÍCH  $\log$  (hằng số Euler) =  $\log(0,5772) = -0,2507$ .

Trong đó  $N_0$  là số lượng vi sinh vật sống ban đầu trong mỗi mẫu thử nghiệm (xem Phụ lục A).

D.3.1.2.7 95% khoảng tin cậy đối với  $\bar{D}$  ( $p = 0,05$ )  $D_{calc}$ , được tính toán bằng công thức sau:

$$D_{calc} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$$

D.3.1.2.8 Phương sai,  $V$ , được tính toán theo công thức sau:

$$V = a \left( \frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2$$

D.3.1.2.9 giá trị "a" cho phương sai được tính toán bằng công thức sau:

$$a = 0,25 \sum_{i=2}^{i=6} [t_{(i+1)} - t_{(i-1)}]^2 \left[ r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_i - 1)} \right]$$

D.3.1.3 Ví dụ tính toán theo phương pháp Holcomb-Spearman-Karber (HSKP)

**Bảng D.2— Các ví dụ về số liệu với các khoảng thời gian không hằng định và số lượng mẫu thử không hằng định**

Thời gian tiếp xúc với chất khuẩn min $t$	Số lượng mẫu thử tiếp xúc $n$	Số lượng mẫu thử không phát triển $r_i$
$t_1 = 10$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0$
$t_2 = 18$	$n_2 = 19$	$r_2 = 4$
$t_3 = 28$	$n_3 = 21$	$r_3 = 8$
$t_4 = 40$	$n_4 = 20$	$r_4 = 12$
$t_5 = 50$	$n_5 = 20$	$r_5 = 16$
$t_6 = 60$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20$
$t_7 = 70$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20$

D.3.1.3.1 Tính  $\chi_i$  và  $\gamma_i$  (đối với mỗi lần tiếp xúc):

$$\chi_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2}$$

$$\chi_1 = \frac{t_1 + t_{(1+1)}}{2}$$

$$\chi_1 = \frac{10 + 18}{2} = 14$$

$$\chi_2 = \frac{18 + 28}{2} = 23$$

$$\chi_3 = \frac{28 + 40}{2} = 34$$

$$\chi_4 = \frac{40 + 50}{2} = 45$$

$$\chi_5 = \frac{50 + 60}{2} = 55$$

$$\chi_6 = \frac{60 + 70}{2} = 65$$

$$\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1} - \frac{r_i}{n_i}$$

$$\gamma_1 = \frac{r_1 + 1}{n_1 + 1} - \frac{r_1}{n_1}$$

$$\gamma_1 = \frac{4}{9} - \frac{0}{20} = 0,21$$

$$\gamma_2 = \frac{8}{21} - \frac{4}{19} = 0,17$$

$$\gamma_3 = \frac{12}{20} - \frac{8}{21} = 0,22$$

$$\gamma_4 = \frac{16}{20} - \frac{12}{20} = 0,2$$

$$\gamma_5 = \frac{20}{20} - \frac{16}{20} = 0,2$$

$$\gamma_6 = \frac{20}{20} - \frac{20}{20} = 0$$

**CHÚ THÍCH** Để tính  $\gamma_4$  và  $\gamma_5$ , cả  $\gamma_6 = 0,2$ . Điều này xảy ra do số lượng mẫu thử không có biểu hiện của sự phát triển của vi sinh vật ở một tốc độ nhất định trong ví dụ này.

**D.3.1.3.2** Tính  $U_i$  cho mỗi thời gian tiếp xúc,  $t_i$ :

$$U_i = \chi_i \gamma_i$$

$$U_1 = x_1 \gamma_1 = 14 \times 0,21 = 2,94$$

$$U_2 = 23 \times 0,17 = 3,91$$

$$U_3 = 34 \times 0,22 = 7,48$$

$$U_4 = 45 \times 0,2 = 9,0$$

$$U_5 = 55 \times 0,2 = 11,0$$

$$U_6 = 65 \times 0 = 0$$

D.3.1.3.3 Thời gian trung bình đạt vô khuẩn,  $U_{HSK}$ , được tính toán theo công thức sau:

$$U_{HSK} = \sum_{i=1}^{i=6} \mu_i$$

$$U_{HSK} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6$$

$$U_{HSK} = 2,94 + 3,91 + 7,48 + 9,0 + 11,0 + 0 = 34,33$$

D.3.1.3.4 Giá trị D trung bình,  $\bar{D}$ , được tính theo công thức sau:

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

trong đó

$N_0$  = quần thể ban đầu của  $1 \times 10^5$ ;

$$\bar{D} = \frac{34,33}{5,000 + 0,2507} = 6,54 \text{ min}$$

D.3.1.3.5 Khoảng tin cậy 95% cho giá trị được  $\bar{D}(p = 0,05)D_{calc}$  tính theo công thức sau:

$$D_{calc} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$$

D.3.1.3.6 Phương sai, V, được tính theo công thức sau:

$$V = a \left( \frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2$$

D.3.1.3.7 giá trị "a" trong công thức phương sai cho mỗi  $t_i$  và tổng cho tất cả các kết quả được tính toán theo công thức sau:

$$a = 0,25 \sum \left\{ (t_{(i+1)} - t_{(i-1)})^2 \left[ r_i \frac{n_i - r_i}{n_i^2 (n_i - 1)} \right] \right\}$$

$$a = 0,25 \left\{ (t_{1+1} - t_{1-1})^2 \left[ r_1 \frac{n_1 - r_1}{n_1^2 (n_1 - 1)} \right] + (t_{2+1} - t_{2-1})^2 \left[ r_2 \frac{n_2 - r_2}{n_2^2 (n_2 - 1)} \right] + (t_{3+1} - t_{3-1})^2 \left[ r_3 \frac{n_3 - r_3}{n_3^2 (n_3 - 1)} \right] \right. \\ \left. + (t_{4+1} - t_{4-1})^2 \left[ r_4 \frac{n_4 - r_4}{n_4^2 (n_4 - 1)} \right] + (t_{5+1} - t_{5-1})^2 \left[ r_5 \frac{n_5 - r_5}{n_5^2 (n_5 - 1)} \right] + (t_{6+1} - t_{6-1})^2 \left[ r_6 \frac{n_6 - r_6}{n_6^2 (n_6 - 1)} \right] \right\}$$



$$a = 0,25 \times \left[ (28-10)^2 \times 4 \left( \frac{19-4}{361 \times 18} \right) \right] = 2,9917 + (40-18)^2 \times 8 \left( \frac{21-8}{441 \times 20} \right) = 5,7070 + (50-28)^2 \times 12 \left( \frac{20-12}{400 \times 19} \right) \\ = 6,1137 + (60-40)^2 \times 16 \left( \frac{20-16}{400 \times 19} \right) = 3,3684 + (70-50)^2 \times 20 \left( \frac{20-20}{400 \times 19} \right) = 0,0000 ]$$

$$a = 0,25[2,9917 + 5,7070 + 6,1137 + 3,3684 + 0,0000] = 0,25 \times 18,1808$$

$$a = 0,25 \times 18,1808 = 4,5452$$

**D.3.1.3.8** Phương sai,  $V$ , được tính toán theo công thức sau khi "a" đã được tính:

$$V = a \left( \frac{2,3026}{\ln N_0 + 0,5772} \right)^2$$

trong đó

$$N_0 = 1 \times 10^5$$

$$V = 4,5452 \left[ \frac{2,3026}{\ln(1 \times 10^5 + 0,5772)} \right]^2 \\ = 4,5452 \left( \frac{2,3026}{11,513 + 0,5772} \right)^2 \\ = 4,5452 \times (0,19045)^2 = 4,5452 \times 0,03627$$

$$V = 0,1649$$

**D.3.1.3.9** Khoảng tin cậy 95% cho giá trị  $\bar{D}$  ( $p=0,05$ )  $D_{calc}$  được tính toán theo công thức sau:

$$D_{calc} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$$

**D.3.1.3.10** Giới hạn dưới của khoảng tin cậy:

$$D_{calc} = \bar{D} - 2\sqrt{V} \\ = 6,54 - 2\sqrt{0,1649} \\ = 6,54 + (2 \times 0,4061) = 5,73$$

**D.3.1.3.11** Giới hạn trên của khoảng tin cậy:

$$D_{calc} = \bar{D} + 2\sqrt{V} \\ = 6,54 + 2\sqrt{0,1649} \\ = 6,54 + (2 \times 0,4061) = 7,35$$

## D.3.2 Quy trình Holcomb-Spearman-Karber giới hạn (LHSKP)

### D.3.2.1 Tính toán bằng phương pháp LHSKP

D.3.2.1.1 Các tính toán bằng phương pháp LHSKP đều dựa trên tối thiểu là 5 lần tiếp xúc và cần kèm theo ít nhất một điều kiện sau:

- một bộ mẫu thử mà tất cả các mẫu trong đó đều có biểu hiện phát triển của vi sinh vật;
- hai bộ mẫu thử trong đó một phần của các mẫu thử có biểu hiện của vi sinh vật;
- hai bộ mẫu thử trong đó không có mẫu thử nào có biểu hiện phát triển của vi sinh vật (xem Bảng D.3).

D.3.2.1.2 Quy trình LHSK tương tự như HSKP (xem D.3.1), ngoại trừ việc phương pháp này sử dụng một công thức cần số lượng thử nghiệm lặp lại giống nhau ở mỗi điều kiện tiếp xúc và khoảng cách thời gian hằng định giữa các lần tiếp xúc.

**Bảng D.3— Ví dụ về số liệu thu được cho quy trình LHSKP với khoảng thời gian hằng định và số lượng mẫu không đổi**

Thời gian tiếp xúc với chất khử khuẩn min $t$	Số lượng mẫu thử tiếp xúc $n$	Số lượng mẫu thử không mọc $r_i$
$T_1(U_1)$	$n_1$	$r_1(r=0)$
$t_2$	$n_2$	$r_2$
$t_3$	$n_3$	$r_3$
$t_4$	$n_4$	$r_4$
$T_5(U_{k-1})$	$n_5$	$r_5$
$t_6(U_k)$	$n_6$	$r_6(r=n)$
$t_7$	$n_7$	$r_7(r=n)^a$

<sup>a</sup> Thử nghiệm chỉ có giá trị nếu không có đơn vị âm tính nào, ví dụ không có mẫu âm tính nào ( $r=0$ ), với tất cả các mẫu không mọc ở lần tiếp xúc trước  $U_i$  và tất cả các mẫu lặp lại âm tính ( $r=n$ ) ví dụ: không mẫu lặp lại nào mọc ở thời điểm tiếp xúc sau  $U_k$ .

D.3.2.1.3 Thời gian trung bình để đạt vô khuẩn,  $U_{HSK}$ , được tính theo công thức sau:

$$U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$$

trong đó

$U_{HSK}$  thời gian trung bình đạt vô khuẩn;

$U_k$  tiếp xúc đầu tiên không có vi sinh vật mọc ở mẫu lặp lại;

$d$  là thời gian hoặc khoảng thời gian giữa các lần tiếp xúc (giống hệt nhau);

$n$  là số lượng mẫu lặp lại mỗi lần tiếp xúc (số nhận dạng ở mỗi lần tiếp xúc, ví dụ 20);

$N_0$  là số lượng vi sinh vật sống trung bình đếm cho mỗi chất chỉ thị xác định bởi phương pháp đếm tổng số sống (xem Phụ lục A);

$\sum_{i=1}^{k-1} r_i$  là tổng của các giá trị âm giữa  $U_2$  và  $U_{k-1}$ .

D.3.2.1.4 Giá trị  $D$  trung bình,  $\bar{D}$ , có thể được tính theo công thức sau:

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

CHÚ THÍCH Khi sử dụng công thức trên, phương pháp LHSK cho phép tính toán phương sai  $V$ , độ lệch chuẩn (SD) và khoảng tin cậy 95% (giới hạn trên và dưới của khoảng tin cậy).

D.3.2.1.5 Phương sai  $V$  được tính theo công thức sau:

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i)$$

D.3.2.1.6 Độ lệch chuẩn (SD) được tính theo công thức sau:

$$SD = \sqrt{V}$$

D.3.2.1.7 Khoảng tin cậy 50% cho giá trị  $\bar{D}$  ( $p=0,05$ )  $D_{calc}$ , được tính toán theo công thức sau:

$$D_{calc} = \bar{D} \pm 2SD \text{ giới hạn}$$

D.3.2.1.8  $D$  giới hạn dưới của khoảng tin cậy

$$= \frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

D.3.2.1.9  $D$  giới hạn trên của khoảng tin cậy

$$= \frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

D.3.2.2 Ví dụ tính toán theo quy trình Limited Holcomb-Spearman-Karber procedure (LHSPK)

Bảng D.4—Các ví dụ số liệu với khoảng thời gian không đổi và số lượng mẫu không đổi

Thời gian tiếp xúc với chất khử khuẩn min $t$	Số lượng mẫu thử tiếp xúc $n$	Số lượng mẫu thử không có dấu hiệu phát triển (mọc) $r_i$
$t_1 = 20(U_1)$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0(r=0)$
$t_2 = 22$	$n_2 = 20$	$r_2 = 1$
$t_3 = 24$	$n_3 = 20$	$r_3 = 7$
$t_4 = 26$	$n_4 = 20$	$r_4 =$
$t_5 = 28(U_{k-1})$	$n_5 = 20$	$r_5 =$
$t_6 = 30(U_k)$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20(r=n)^a$
$t_7 = 32$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20(r=n)$

<sup>a</sup> Thử nghiệm chỉ có giá trị nếu không có đơn vị âm tính nào, ví dụ không có mẫu âm tính nào ( $r=0$ ), với tất cả các mẫu không mọc ở lần tiếp xúc trước  $U_i$  và tất cả các mẫu lặp lại âm tính ( $r=n$ ) ví dụ: không mẫu lặp lại nào mọc ở thời điểm tiếp xúc sau  $U_k$ .

D.3.2.2.1 Giá trị  $D$  được tính theo công thức sau:

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0,2507}$$

trong đó  $N_0 = 1 \times 10^6$

D.3.2.2.2 Thời gian tiếp xúc trung bình  $U_{HSK}$  cần thiết để đạt được tình trạng vô khuẩn được tính theo công thức sau:

$$U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$$

trong đó

$$U_k = 30$$

$$d = 2$$

$$n = 20$$

$$N_0 = 1 \times 10^6$$

$$U_{HSK} = 30 - \frac{2}{2} - \frac{2}{20} \times (0 + 0 + 1 + 7 + 15 + 19) = 24,8$$

$$\bar{D} = \frac{24,8}{6,000 + 0,2507} = 3,97 \text{ min (làm tròn đến 1 chữ số thập phân } D = 4,0 \text{ min)}$$

D.3.2.2.3 Phương sai  $V$ , được tính theo công thức sau:

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i) = \frac{2^2}{(20)^2(20-1)} \times [(1 \times 19) + (7 \times 13) + (15 \times 5) + (19 \times 1)] = 0,1074$$

D.3.2.2.4 Độ lệch chuẩn ( $SD$ ) được tính theo công thức sau:

$$SD = \sqrt{V}$$

$$SD = \sqrt{0,1074} = 0,3277$$

D.3.2.2.5 Khoảng tin cậy 95% của giá trị  $\bar{D}$  ( $p = 0,05$ ),  $D_{calc}$ , được tính toán theo công thức sau:

$$D_{calc} = \bar{D} \pm 2SD$$

$$D \text{ giới hạn dưới của khoảng tin cậy} = \frac{U_{HSK} - 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} = \frac{24,8 - (2 \times 0,3227)}{6,000 + 0,2507} = \frac{24,144}{6,2507} = 3,86 \text{ min}$$

trong đó

$$N_0 = 1 \times 10^6$$

$$D \text{ giới hạn trên của khoảng tin cậy} = \frac{U_{HSK} + 2SD}{\log_{10} N_0 + 0,2507} = \frac{24,8 + (2 \times 0,3227)}{6,000 + 0,2507} = \frac{25,455}{6,2507} = 4,07 \text{ min}$$

### D.3.3 Quy trình Stumbo-Murphy-Cochran-Procedure(SMCP)

#### D.3.3.1 Giới thiệu

D.3.3.1.1 Các phương pháp khác để phân tích các số liệu âm tính có thể dùng tương đương với phương pháp trong D.3.1 và D.3.2 được trình bày ở đây.

D.3.3.1.2 SMCP một phương pháp số có khả năng nhất (MPN – most probable number) có thể áp dụng trong thực tế khi đặc điểm đáp ứng có thể dự đoán được.

D.3.3.1.3 Công thức cho phương pháp SMCP cần kết quả của phạm vi phân số âm tính bao gồm thời gian,  $t$ , số đơn vị không mọc,  $r$ , số lần lặp lại,  $n$ , ở một lần tiếp xúc với phạm vi phân số âm và số lượng vi sinh vật ban đầu cho mỗi lần lặp lại,  $N_0$ .

D.3.3.1.4 Để có được số liệu có giá trị cho phương pháp SMCP, giá trị  $D$  cần được tính trung bình cho ít nhất ba lần chạy trong phạm vi phân số âm để khẳng định khả năng lặp lại được.

D.3.3.1.5 Chất liệu được sử dụng tương tự như trong D.2.

D.3.3.1.6 Đối với khoảng tin cậy 95%, không dưới 50 lần lặp lại cho mỗi điều kiện tiếp xúc cần được tiến hành và điều kiện  $r/n < 0,9$  cần được đáp ứng để thiết lập tiêu chuẩn thử nghiệm tương đương với phần D.3.1 và D.3.2. Các mẫu thử cần tuân theo các điều kiện tiếp xúc đã định trong cửa sổ tồn tại-tiêu diệt của lô sản phẩm.

#### D.3.3.2 Tính toán bằng quy trình Stumbo-Murphy-Cochran-Procedure

D.3.3.2.1 Giá trị  $D$  được tính toán theo công thức sau:

$$D = \frac{t}{\log_{10} A - \log_{10} B}$$

trong đó

$t$  là thời gian tiếp xúc

$\log_{10} A = \log_{10}$  của mật độ ban đầu,  $N_0$ , cho mỗi lần lặp lại

$\log_{10} B = \log_{10}$  của mật độ sau thời gian tiếp xúc,  $t$ .

D.3.3.2.2 Công thức này có thể được áp dụng cho các bộ số liệu phân số âm:

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left( \ln \frac{n}{r} \right)}$$

hoặc

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} N_{\mu i}}$$

trong đó  $\log_{10} B = \log_{10} (\ln n/r)$  hoặc  $\log_{10} [2,303 \log_{10} (n/r)]$

và trong đó

$N_{\mu i}$  là logarit tự nhiên của thương số của số các mẫu lặp lại cho mỗi thử nghiệm chia cho số mẫu âm tính;

$n$  là số lượng lặp lại cho mỗi lần tiếp xúc;

$r$  là số đơn vị được tiết khuẩn hoặc không mọc (vi sinh vật không phát triển).

D.3.3.2.3 Khoảng tin cậy 95 % cho giá trị  $\bar{D}$  ( $p=0,05$ )  $D_{calc}$  được tính theo công thức sau:

$$D_{calc} = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left( \ln \frac{(1)}{a} \right)}$$

trong đó  $a = \frac{r}{n} \pm 1,96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r/n}{n}}$

D.3.3.2.4 Công thức trên chỉ có thể sử dụng nếu  $n \times \frac{r}{n} \times \frac{n-r}{n}$  là  $\geq 0,9$

### D.3.3.3 Các ví dụ tính toán SMCP

**Bảng D.5—Tính toán giá trị  $D$  chỉ sử dụng một bộ số liệu trong vùng phân số âm tính**

Thời gian tiếp xúc min $t$	Số lượng mẫu thử tiếp xúc $N$	Số lượng mẫu thử có biểu hiện phát triển $r$
$t = 24$	$n = 100$	$r = 37$

D.3.3.3.1 Giá trị  $D$  được tính toán theo công thức sau:

$$D = \frac{t}{\log_{10} N_0 - \log_{10} \left( \ln \frac{n}{r} \right)}$$

trong đó

$t$  là thời gian tiếp xúc

$N_0$  là số lượng vi sinh vật ban đầu trên mỗi mẫu thử nghiệm =  $1 \times 10^6$ ;

$\log_{10} A = \log_{10}$  của mật độ vi sinh vật ban đầu,  $N_0$ , trong mỗi mẫu thử;

$\log_{10} B = \log_{10}$  mật độ vi sinh vật sau thời gian tiếp xúc,  $t$ ,

hoặc  $= \log_{10} (\ln n/r)$  hoặc  $\log_{10} [2,303 \log_{10} (n/r)]$ ;

$n$  là số lượng nhân lên trong mỗi khoảng thời gian tiếp xúc;

$r$  là số lượng các đơn vị được tiết khuẩn hay không có biểu hiện phát triển vi sinh vật.

$$D = \frac{24}{6,000 - \log_{10} (\ln 2,7027)}$$

$$D = \frac{24}{6,000 - \log_{10} (0,9943)}$$

$$D = \frac{24}{6,000 - (-0,0025)} = \frac{24}{6,0025} = 4,00 \text{ min (làm tròn đến một số thập phân } D = 4,0 \text{ min)}$$

D.3.3.3.2 Khoảng tin cậy 95 % đối với giá trị  $\bar{D}(p = 0,05) D_{\text{calc}}$  được tính toán theo công thức sau:

Nếu  $n \times \frac{r}{n} \times \frac{n-r}{n} \geq$  đến 0,9, sau đó khoảng tin cậy 95 % có thể được tính theo phương trình sau:

$$D \text{ giới hạn dưới của khoảng tin cậy} = \frac{t}{\log N_0 - \log_{10} (\ln 1/a)}$$

trong đó

$$a = \frac{r}{n} + 1,96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r}{n}}$$

$$D_{\text{calc}} = \frac{24}{6,000 - \log_{10} (\ln 1/a)}$$

trong đó

$$a = \frac{37}{100} + 1,96 \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}} = 0,37 + 1,96 \sqrt{0,37 \times \frac{0,63}{100}}$$

$$= 0,37 + 1,96 \sqrt{0,37 \times 0,0063} = 0,37 + 1,96 \sqrt{0,002331} = 0,37 + 1,96 \times 0,04828$$

$$a = 0,465$$

$$D_{calc} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}\left(\ln \frac{1}{0,465}\right)} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}(0,7657)} = \frac{24}{6,000 - (-0,1159)} = \frac{24}{6,000 + 0,1159}$$

$$D_{calc} = \frac{24}{6,1159} = 3,92$$

$$D \text{ giới hạn trên của khoảng tin cậy} = \frac{t}{\log N_0 - \log_{10}(\ln I/a)}$$

trong đó

$$a = \frac{r}{n} - 1,96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r}{n}}$$

$$D_{calc} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}(\ln I/a)}$$

trong đó

$$a = \frac{37}{100} - 1,96 \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}} = 0,37 - 1,96 \sqrt{0,37 \times \frac{0,63}{100}} = 0,37 - 1,96 \sqrt{0,37 \times 0,0063}$$

$$= 0,37 - 1,96 \sqrt{0,002331} = 0,37 - 1,96 \times 0,04828$$

$$a = 0,37 - 0,095 = 0,275$$

$$D_{calc} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}\left(\ln \frac{1}{0,275}\right)} = \frac{24}{6,000 - \log_{10}(1,291)} = \frac{24}{6,000 - 0,111} = \frac{24}{5,889} = 4,08$$



## Phụ lục E

(quy định)

### Các đặc trưng đáp ứng tồn tại-tiêu diệt

#### E.1 Giới thiệu chung

Theo dõi các đặc trưng của đáp ứng tồn tại-tiêu diệt của một lô chất chỉ thị sinh học là cách để đảm bảo hiệu lực của đồng nhất của các đơn vị trong mỗi lô sản phẩm nhất định.

#### E.2 Chất liệu

**E.2.1** Các mẫu thử cần đại diện cho dịch treo, chất mang đã cấy, hoặc chất chỉ thị sinh học đã được bao gói.

**E.2.2** Sử dụng thiết bị đo các tổ hợp đối chứng tương ứng.

**CHÚ THÍCH** Các phương pháp thử nghiệm được trình bày trong phần thuộc TCVN 9855 (ISO 11138). Các thông số của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được trình bày trong phần tiêu chuẩn cho thiết bị đo các tổ hợp đối chứng (xem ISO 18472).

**E.2.3** Tủ cấy nên được cài đặt và được giám sát để xác định nhiệt độ cụ thể trong môi trường nuôi cấy.

**E.2.4** Môi trường phát triển cần tuân theo các yêu cầu của điều kiện nuôi cấy.

#### E.3 Phương pháp

**E.3.1** Cần lặp lại không dưới 50 lần để khẳng định cả thời gian tồn tại và thời gian tiêu diệt (xem Bảng 2). Giá trị  $D$  được tính toán bằng phương pháp đường cong sống sót (xem Phụ lục C) hoặc phương pháp phân số âm (xem Phụ lục D) cần được sử dụng để quy định các đặc điểm của đáp ứng tồn tại - tiêu diệt.

**E.3.2** Mẫu nên được nuôi cấy sau khi đã phơi nhiễm theo phương pháp chỉ định bởi nhà sản xuất.

**E.3.3** Đặc trưng tính năng tồn tại - tiêu diệt là thời gian tiếp xúc được ghi nhận mà các vi sinh vật tồn tại đối với mỗi chất chỉ thị sinh học. Đặc trưng tính năng tiêu diệt là thời gian được ghi nhận mà tất cả các vi sinh vật thử nghiệm bị tiêu diệt đối với mỗi chất chỉ thị sinh học.

**E.3.4** Đặc trưng tính năng tồn tại - tiêu diệt có thể được cần được xác định trong thiết bị đo các tổ hợp đối chứng áp dụng các thông số sử lý của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng.

**CHÚ THÍCH** Các điều kiện tham chiếu đối với các quá trình tiệt khuẩn được trình bày trong các phần sau của TCVN 9855 (ISO 11138).

**E.3.5** Giá trị phù hợp cho thời gian tồn tại và thời gian tiêu diệt có thể được tính theo các phương trình sau:

Thời gian tồn tại = không nhỏ hơn  $(\log_{10} \text{mật độ danh nghĩa} - 2) \times \text{giá trị D}$ ;

Thời gian tiêu diệt = không lớn hơn  $(\log_{10} \text{mật độ danh nghĩa} + 4) \times \text{giá trị D}$ .






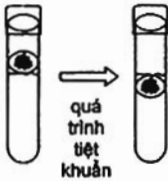
**E.3.6** Số lượng các đơn vị chạy cho mỗi lần tiếp xúc sẽ phụ thuộc vào cả khả năng và đặc điểm vận hành của thiết bị đo các tổ hợp đối chứng được sử dụng. Có thể cần chạy tiếp xúc vài lần ở cả thời gian tồn tại và thời gian tiêu diệt để kiểm tra tổng số đơn vị cần thiết.

## Phụ lục F

(tham khảo)

## Mối liên quan giữa các thành phần của chất chỉ thị sinh học

Bảng F.1—Mối liên quan giữa các thành phần của chất chỉ thị sinh học

Hình minh họa	Thành phần	Thuật ngữ
	vi sinh vật	vi sinh vật thử nghiệm
	vi sinh vật trong dịch treo <sup>a</sup>	thử nghiệm vi sinh vật trong dịch treo <sup>b</sup>
	vi sinh vật được cấy trên bề mặt <sup>c</sup>	vật liệu mang chủng <sup>b</sup>
	vật liệu mang chủng trong bao gói trực tiếp	chất chỉ thị sinh học được bao gói riêng
	môi trường phát triển với chất mang đã được xử lý cấy	thử nghiệm tính chất phát triển của chất mang đã được xử lý cấy.
 quá trình tiệt khuẩn chưa được xử lý	sẵn sàng sử dụng hệ thống phối hợp giữa vật liệu mang chủng và môi trường phát triển	chất chỉ thị sinh học có sẵn
<p><b>CHÚ THÍCH:</b> Hình minh họa phản ánh sự phân bố về mặt vật lý của các thành phần phân bày trong hình. Dịch treo chứa vi sinh vật thử nghiệm có các môi trường treo như là chất mang không phải là chất rắn (xem 3.2).</p>		
<p><sup>a</sup> Dịch được sử dụng có thể thay đổi tùy thuộc vào vi sinh vật có thể giữ được với mục đích bảo quản hay được dùng cho mục đích thử nghiệm.</p>		
<p><sup>b</sup> Có thể được định nghĩa là chất chỉ thị sinh học nếu được sử dụng để giám sát quá trình tiệt khuẩn.</p>		
<p><sup>c</sup> Trong một số trường hợp, bề mặt có thể là đối tượng để thử nghiệm.</p>		

### Thư mục tài liệu tham khảo

- [1] TCVN 6398 (ISO 31) (tất cả các phần), *Đại lượng và đơn vị đo*.
- [2] ISO 690:1987, *Documentation— Bibliographic references— Content, form and structure*
- [3] TCVN 7783:2008 (ISO 1000:1992) *Đơn vị SI và khuyến nghị sử dụng các bội số của chúng và một số đơn vị khác*.
- [4] TCVN 7783:2008 (ISO 1000:1992)/Sửa đổi 1:1998, *Đơn vị SI và khuyến nghị sử dụng các bội số của chúng và một số đơn vị khác - Sửa đổi 1*
- [5] TCVN ISO 14000 (ISO 10241:1992), *Tiêu chuẩn thuật ngữ quốc tế — Soạn thảo và trình bày*
- [6] ISO/TS 11139, *Sterilization of healthcare products—Vocabulary*
- [7] TCVN 8583:2010 (ISO 14161:2000), *Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe – Chất thì thị sinh học – Hướng dẫn lựa chọn, sử dụng và trình bày kết quả*.
- [8] TCVN 8582:2010 (ISO 14937:2000), *Tiệt khuẩn sản phẩm chăm sóc sức khỏe— Yêu cầu chung đối với đặc tính của tác nhân tiệt khuẩn, triển khai, đánh giá xác nhận và kiểm soát thường quy quá trình tiệt khuẩn thiết bị y tế*
- [9] TCVN 6001 (IEC 60027) (tất cả các phần), *Thiết bị điện y tế*
- [10] ARMITAGE, P. and ALLEN, I., *Methods of Estimating the LD50 in Quantal Response Data*, *J. of Hyg. Vol. XLVIII, pp. 298-322, 1950*
- [11] COCHRAN, W.G., *Estimation of Bacterial Densities by Means of the "Most Probable Number"*, *Biometrics, Vol. 6, No. 1, pp. 105-116, 1950* (*Ước tính mật độ vi khuẩn bằng các phương tiện của "Số xác suất lớn nhất", Sinh học*)
- [12] GADDUM, J.H., *Report on biological standards, III, Methods of biological assay depending on a quantal response*, *Spec. Rep. Ser. Med. Res. Council, London, No. 183, 1933* (*Tiêu chuẩn sinh học, III, Phương pháp khảo nghiệm sinh học phụ thuộc vào một phản ứng định lượng*)
- [13] HALVORSON, H.O and ZIEGLER, N.R., *Application of statistics to problems in bacteriology*, *J. Bact. 25, pp. 101-121, 1933* (*Áp dụng số liệu thống kê cho các vấn đề trong vi khuẩn*)
- [14] HOLCOMB, R.G. and PFLUG, I.J., *The Spearman-Kärber method of analyzing quantal assay microbial destruction data*, in: *Pflug I.J., ed., Selected Papers on the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes, 5th edn., Minneapolis, Environmental Sterilization Laboratory, pp. 83-100, 1988* (*Phương pháp Spearman-Kärber phân tích xét nghiệm định lượng vi sinh vật phá hủy dữ liệu*)

- [15] JOHNSON, E.A. and BROWN, B.,Wm.,Jr., *The Spearman Estimator for Serial Dilutions Assays*, *Biometrics*, Vol.17, pp.79-88, 1961 (Phương pháp Spearman đối với chuỗi xét nghiệm pha loãng, sinh học)
- [16] LEWIS, J.C., *The Estimation of Decimal Reduction Times*, *Appl. Micro.*, Vol.4, pp.211-221, 1956 (Ước tính giảm phân số thập phân)
- [17] MOSLEY, G.A. and GILLIS, J.R., *Operating Precision of Steam BIER vessels and the Interactive Effects of varying Z Valves on the Reproducibility of Listed D Values*, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Vol.56, No.6, pp.318-331, 2002 (Hoạt động chính xác của hơi nước BIER và những ảnh hưởng tương tác khác nhau Z Valveson lặp lại của các giá trị niêm yết D)
- [18] MOSLEY, G.A., *Estimating the Effects of EtOBIER-Vessel Operating Precision on D Value Calculations*, *MD&DI*, vol.24(4), pp.46-52, 2002 (Ước tính ảnh hưởng của hệ điều hành EtOBIER – Tính rõ ràng trên các tính toán giá trị D)
- [19] Mosley, G.A., Gillis, J. and Whitbourne, J., *Calculating Equivalent Time for Use in Determining the Lethality of EtO Sterilization Processes*, *M D & DI*, vol.24(2), pp.54-63, 2002 (Tính toán thời gian tương đương để sử dụng trong xác định quá trình tiệt khuẩn EtO)
- [20] PFLUG, I.J., HOLCOMB, R.G. and GOMEZ, M.M., *Thermal Destruction of Microorganisms, in Disinfection, Sterilization and Preservation*, Block, Seymour S. (ed) Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, pp 79-129, 2001 (Nhiệt tiêu hủy vi sinh vật trong tiệt khuẩn và bảo quản)
- [21] PFLUG, I.J., *Microbiology and Engineering of Sterilization Processes*, 11th Edition, Environmental Sterilization Services, Minneapolis, 2003
- [22] PFLUG, I.J., *Microbiology and Engineering of Sterilization Processes*, St. Paul, University of Minnesota, 1992, ISBN 0-929340-01-9 (Vi sinh vật và kỹ thuật của quá trình tiệt khuẩn)
- [23] REED, L.J. and MUENCH, H.A., *Simple Method of Estimating Fifty percent Endpoints*, *Amer. J. of Hyg.* Vol.27, No.3, pp.493-497, 1938 (Phương pháp đơn giản Ước tính năm mươi % thiết bị đầu cuối)
- [24] SCHMIDT, C.F., *Thermal resistance of microorganisms, in Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization*. (G.F. Reddish, ed) 1st., pp.720-759, Lea and Febiger, Philadelphia (Sức đề kháng của vi sinh vật, thuốc sát khuẩn, khử khuẩn, thuốc diệt nấm và tiệt khuẩn)
- [25] SPEARMAN, C., 1908. *The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae*, *Brit. J. Psychol.* 2, p.227 (Phương pháp của trường hợp đúng và sai ngoài công thức Gauss)
- [26] STUMBO, C.R., MURPHY, J.R. and COCHRAN, J., *Nature of Thermal Death Time Curves for P.A.3679 and Clostridium Botulinum*, *Food Technology*, 4, pp.321-326, 1950

- [27] *World Health Organization, Laboratory Biosafety Manual, 2nd edn., WHO, Geneva, 1993 ISBN92-4-154450-3 (Tổ chức Y tế Thế giới, Hướng dẫn sử dụng phòng thí nghiệm an toàn sinh học)*
- [28] *United States Pharmacopoeia, official revision and Monographs for specific BIs;<55>, Biological Indicators—Resistance Performance Tests:<1035> Biological Indicators for Sterilization (Chất chỉ thị sinh học – Phép thử kháng – Chất chỉ thị sinh học cho quá trình tiệt khuẩn)*
- [29] GRAHAM, G.S. and C.A., BORIS, *Chemical and Biological Indicators, Sterilization technology: A Practical Guide for Manufacturers and Users of Healthcare Products, Eds. Morrissey, R.F. and Phillips, G.B., VanNostrandReinhold, NY, 1993, ISBN0-442-23832-0 (Chất chỉ thị hóa và sinh học, Kỹ thuật tiệt khuẩn, Hướng dẫn thực hành cho các nhà sản xuất và người sử dụng các sản phẩm chăm sóc sức khỏe)*
- [30] FRITZE and PUKALL, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 51, pp.35-37, 2001 (Tạp chí Quốc tế của hệ thống và tiến hóa vi sinh vật)*
-